

A RecQ helikázok mechanobiokémiája

Sarlós Kata

Doktori (PhD) értekezés

Biológia Doktori Iskola

Iskolavezető: Professzor Erdei Anna

Szerkezeti Biokémia Program

Programvezető: Professzor Gráf László

Témavezető: Dr. Kovács Mihály, tudományos főmunkatárs



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar
Biológiai Intézet
Biokémiai Tanszék

2012

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	4
I. A DNS hibajavításról dióhéjban	4
1. A hibajavítás esszenciális volta.....	4
2. A homológ rekombináció.....	4
II. A helikázok.....	7
1. A helikázokról általában.....	7
2. A helikáz szupercsaládok	8
3. A RecQ család.....	10
III. Metodikai összefoglaló	15
1. A stopped-flow módszer	15
2. A quenched-flow módszer	16
CÉLKITŰZÉSEK	18
EREDMÉNYEK	19
I. Általános módszer nukleinsav motorok mozgásának karakterizálására	19
1. A módszer bemutatása	20
II. A Bloom szindróma helikáz karakterizálása	27
1. Egyszeri futásos kísérletek	28
2. A <i>steady-state</i> ATP fogyasztás ssDNS hosszfüggése megerősíti a transzlokáció kinetikai modelljét.....	30
III. A RecQ helikáz mechanobiokémiája	33
1. A RecQ aktív helyek függetlenül működnek transzlokáció során	33
2. A RecQ működésének kinetikai modellje.....	33
3. Kölcsönhatás a nukleotid szubsztráttal	34
4. Két DNS kötő konformáció és egy zárt állapot észlelése	40
5. A transzlokációs mechanizmus	43
6. Az enzimmechanizmus modelljének igazolása szimulációval.....	58
EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE.....	60
I. Univerzális módszer nukleinsav motorok mozgásának kvantitatív jellemzésére	60
II. A RecQ és BLM helikázok mechanobiokémiai modellje	61
1. Az ATP-áz ciklus	61
2. Interakció a DNS sínnel	62
3. A transzlokáció.....	63
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	68
I. Anyagok.....	68
II. Klónozás, fehérjetermelés és tisztítás.....	68

1. RecQ és BLM.....	68
2. Foszfátkötő fehérje (PBP).....	69
III. Tranziens enzimkinetikai vizsgálatok	70
IV. <i>Steady-state</i> ATP-áz mérések	71
V. Egyensúlyi fluoreszcencia spektroszkópiai vizsgálatok.....	71
VI. Oxigén kicserélődéses kísérletek	71
VII. Adatok elemzése.....	72
ÖSSZEFOGLALÁS.....	73
SUMMARY	74
TÁBLÁZATOK.....	75
ÁBRAJEGYZÉK	81
RÖVIDÍTÉSEK	82
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK.....	84
I. Tudományos közlemények	84
II. Konferencia kivonatok	84
EGYÉB PUBLIKÁCIÓK	85
I. Tudományos közlemények	85
II. Konferencia kivonatok	85
IRODALOMJEGYZÉK.....	86
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	93

BEVEZETÉS

I. A DNS hibajavításról dióhéjban

1. A hibajavítás esszenciális volta

Az élet alapvető információit hordozó molekula a DNS, mely univerzális kódrendszerén keresztül egyrészt a sejtben történő folyamatok végbemeneteléért, másrészt az információ átörökítéséért felelős. A DNS által kódolt információ megőrzése a sejt normális működéshez elengedhetetlen. Az egyik folyamat, amelynek során kismértékű változások kívánatosak a meiózis, mely lehetőséget biztosít új variációk létrejöttéhez, mely a környezeti változásokhoz való alkalmazkodást faji szinten lehetővé teszi.

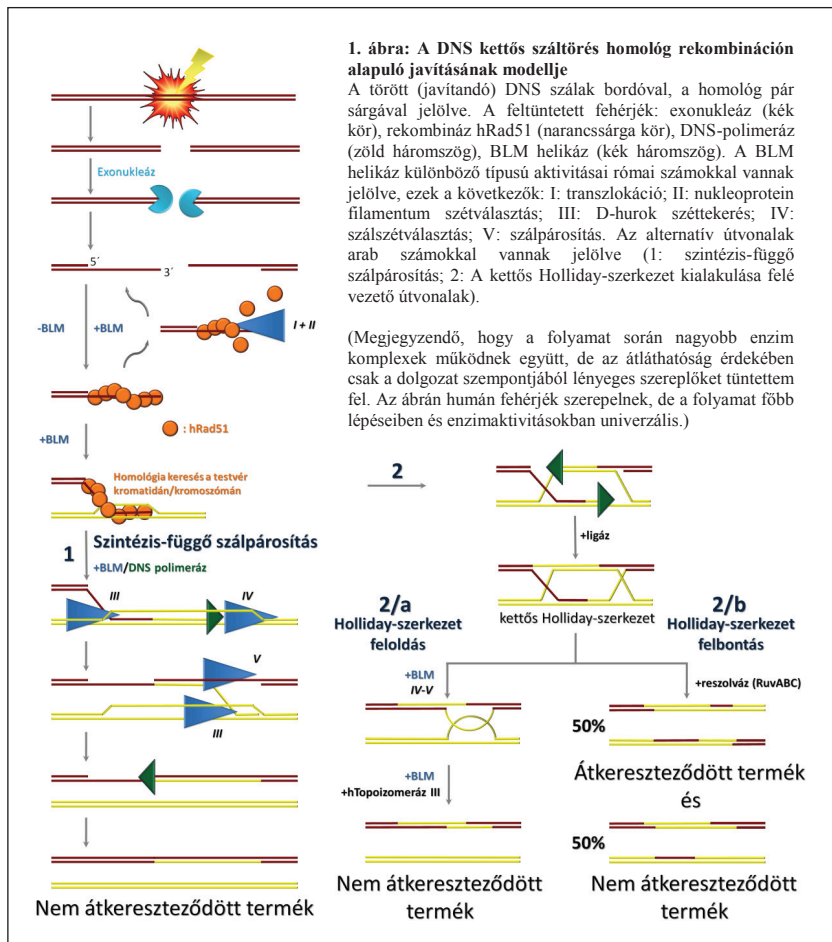
A DNS-t a sejt fiziológiás működése során számos külső és belső károsító hatás éri, e károsító ágensek közé tartoznak például a sejtanyagcsere során keletkező reaktív oxigéngyökök, vagy az UV sugárzás. Számos különböző DNS hibát különíthetünk el, többek között hibás bázisok beépülése, bázis hiánya, timin-dimerek kialakulása, vagy a DNS-be beékelődő, keresztkötő komplexek (pl. cisz-platina) beépülése. Az egyik legtoxikusabb DNS hiba, mely már kis számban sejthalál szignálként léphet fel a DNS kettős szál törés. A különböző DNS-hibák kijavítására az evolúció során konzervált, specifikus útvonalak jöttek létre (pl. bázis-kivágásos javítás, nukleotid kivágásos javítás, „mismatch” (hibás pár) -javítás, stb.), melyekben többnyire nagyméretű enzim komplexek működnek együtt. Ezen útvonalak hatékony, energiaigényes, és specifikus volta jelzi a hibajavítás esszenciális jelentőségét. A hibák gyors felismerése és kijavítása rendkívül fontos, hiszen azok felhalmozódása a sejt anyagcseréjének felborulásához, extrém esetben malignus transzformációhoz vagy sejthalálhoz vezethet.

2. A homológ rekombináció

A sejt számára rendkívül toxikus DNS kettős szál törés hibamentes és információmegőrző javítására kialakult, és evolúciósan konzervált útvonal a homológ rekombináció (HR), mely a homológ pár, illetve a testvér kromatida által kódolt információt használja a törött szál javítására (1. ábra; (1) nyomán). A dolgozat által tárgyalt fő vizsgálati objektumok, a RecQ helikázok ebben a folyamatban számos ponton kulcsszerepet töltenek be. Ember esetén e folyamat egyik legfontosabb szereplője a Bloom szindróma helikáz (BLM). A folyamat főbb lépései a következők: A kettős szál törés felismerését követően egy exonukleáz visszaemésztí az 5' véget, ezáltal egy 3' túlnyúló véget generál. Ez a 3' túlnyúló egyszálú (ss) DNS először egyszálú DNS-kötő fehérjékkel töltődik fel (az ábrán nem szerepel), melyet a rekombináz humán (h) Rad51 aktívan lecserél. A rekombinázal dekorált DNS szál (nukleoprotein

filamentum) képes a homológia keresésére a testvérkromatidán, illetve a homológ kromoszómán. A homológia megtalálásakor a nukleoprotein filamentum „betámad” a két homológ szál közé, kialakítva ezzel az ún. D-hurok szerkezetet. A HR e korai szakaszát nevezzük minőségellenőrzési fázisnak. A BLM helikáz egyik legfontosabb szerepe ennek során az anti-rekombinációs aktivitás, mely egyrészt a nukleoprotein filamentum aktív szétválasztásában, másrészt a D-hurok szerkezet széttekerésében nyilvánul meg (**1. ábra; II-III típusú aktivitások**). Ez az anti-rekombinációs aktivitás rendkívül fontos a HR események számának szabályozásában. A folyamat ezen a ponton két irányba ágazik el. Az egyik útvonal az úgynevezett szintézis-függő szálpárosítás (SDSA), ahol előbb a törött szálpárok egyike egészül ki, majd miután a két vég újra összekapcsolódik, a másik törött vég kiegészüléséhez az előbbi (újonnan kiegészült) szolgál templátul (**1. ábra; 1-es útvonal**). A D-hurok szerkezet kialakulása után a BLM helikáz szétválasztja a homológ pár szálait, hogy a DNS polimeráznak utat biztosítson (**1. ábra; IV típusú aktivitás**). Megfelelően hosszú szakasz létrehozása után a BLM helikáz részvételével történik a D-hurok szerkezet feloldása (**1. ábra; III típusú aktivitás**), ezzel párhuzamosan az újonnan szintetizálódott szakasz a szabad törött véghez illeszkedik (**1. ábra; V típusú aktivitás**). A hiányzó szakaszt a DNS polimeráz tölti fel az eredeti szál szekvenciája alapján. A másik útvonalon (**1. ábra; 2-es útvonal**) a D-hurok szerkezet kialakulása után a másik törött vég is kapcsolódik a komplexhez, így a DNS polimeráz mindkét szálon egyszerre működik. A hiányzó szakaszok megszintetizálása után a végek egymásra találhatnak, így jön létre a kettős Holliday-szerkezet. A kettős Holliday-szerkezet megszüntetésének két módja van, az egyik útvonalon (Holliday-szerkezet feloldás) a BLM helikáz részt vesz (**1. ábra; 2/a útvonal**). Ennek során a BLM helikáz egyrészt az ún., keresztthíd-vándoroltatást („branch-migration”) végzi, másrészt a humán Topoizomeráz III-mal karöltve olyan módon választja szét a kettős Holliday-szerkezetet, melynek eredményeként kizárólag nem átkeresztződött termékek keletkeznek. Az átkeresztződés a DNS hibajavítás során általában nem kívánatos folyamat, mivel ez által az egyes gének különböző allélikus környezetbe kerülhetnek, mely felboríthatja a génexpresszió szabályozását. A másik esetben (Holliday-szerkezet felbontás) nem vesz részt a BLM helikáz, hanem egy reszolváz nevű enzim a keresztződéseknél random módon elvágja a szálakat, majd a katenáltság megszüntetése után újra összeragasztja őket (**1. ábra; 2/b útvonal**). Ezen enzim random működésének eredményeként fele-fele arányban keletkeznek átkeresztződött és nem átkeresztződött termékek. Ez alapján látható, hogy a BLM helikáz megfelelő működése elengedhetetlen egyrészt a HR események számának másrészt a helyes (legitim) rekombinációs események létrejöttének szabályozásában, valamint abban, hogy a

nem átkereszteződött termékeket eredményező útvonalakra terelje a HR irányát. Baktériumokban, pl. *Escherichia coli* (*E. coli*)-ban szintén játszódnak le ehhez hasonló folyamatok, melyekben a RecQ helikáz a BLM-hez hasonló aktivitásokat végez.



II. A helikázok

1. A helikázokról általában

A helikázok olyan motor enzimek, melyek NTP (nukleozid-trifoszfát) hidroliziséből származó kémiai energiát az egy vagy kétszálú nukleinsav sín mentén történő egyirányú elmozdulásá alakítják (transzlokáció), mely a kettős szálú DNS vagy RNS szálainak szétválasztását eredményezi. Gyakorlatilag minden nukleinsav manipulációs folyamatban részt vesznek. Ilyen folyamatok például a DNS replikáció és hibajavítás, vagy a transzkripció és a transláció, stb. Különböző folyamatok során az adott feladatra specializált enzimek fejtik ki aktivitásukat. Ennek következményeként a helikázok minden élő rendszerben megtalálhatók a baktériumoktól egészen az emberig (2). Itt megjegyezném, hogy vannak olyan enzimek is, amelyek ugyan transzlokációt végeznek, ám nem választják szét a kettős nukleinsav szálakat. Ezeket az enzimeket transzlokázoknak nevezzük, melynek egy csoportját alkotják a helikázok.

A nukleotid kötésére alkalmas zseb minden helikáz esetén két konzervált RecA vagy AAA⁺ domén között helyezkedik el (2. ábra). A nukleotid kötésének és hidrolizisének ez az egyforma szerkezeti megoldása a helikázok közös eredetének bizonyítékaként szolgál. Ennek a régióknak a feladata a kémiai energia mechanikai munkává alakítása azáltal, hogy az NTP megkötését és hidrolizisét egy fehérjén belüli szerkezeti változással kapcsolja össze (3). Ebben a folyamatban evolúciósan konzervált szerkezeti elemek vesznek részt, úgymint a Walker A (más néven P-hurok) és B motívum, melyek az NTP kötését és hidrolizisét vezérlik (4), valamint egy Arginin-ujj, mely mechanokémiai kapcsoltságot biztosítja (5).

A helikáz enzimeket jellemezhetjük szerkezeti és mechanisztikus szempontok alapján. A klasszifikáció alapját a konzervált szerkezeti motívumok képezik, melyeket a következő fejezetben (II.2) tárgyalok.

A helikázok fontos jellemzője a nukleinsav szubsztrát specificitás, mely lehet kettős szálú (ds) DNS, dsRNS, vagy DNS/RNS duplex. Emellett a legtöbb helikáz válogat, hogy milyen nukleinsav szerkezetekhez köt preferáltan (pl. egyszálú, kétszálú, ezek találkozása, stb.). Azon helikázokat, melyek a nukleinsav szubsztrát egyik szálához kötnek, jellemezhetjük a direkcionalitással. A direkcionalitás abban nyilvánul meg, hogy az enzim az általa megkötött szál mentén a cukor-foszfát gerinc irányultsága által meghatározott 5'-3' vagy 3'-5' irányban mozog. A mozgás fontos jellemzője a sebesség (dimenziója nukleotid (nt)/s vagy bázispár (bp)/s), a lépésméret (megtett távolság/mechanokémiai ciklus), a mechanokémiai kapcsoltság (hidrolizált NTP/megtett távolság nukleotidban), valamint a processzivitás (a következő lépés

megtételének valószínűsége), melyből az egy futás alatt átlagosan megtett lépések száma kiszámítható.

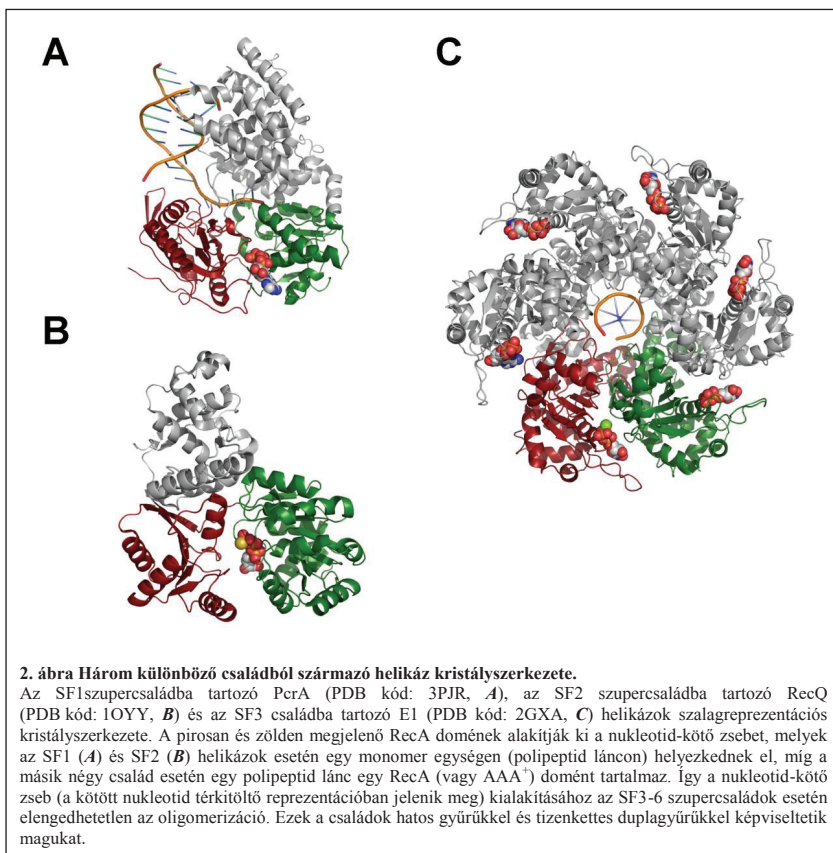
A transzlokációs mechanizmus alapján jelenleg kétfajta modell különíthető el: *i)* „Inchworm”, vagy araszoló mechanizmus, melyet a PcrA (6) és az UvrD (7) helikázok esetén feltételeztek. *ii)* Brown-motor vagy termikus racsni, melyet a hepatitisz C vírus NS3 helikáz (8) esetén feltételeztek. Az araszoló modell szerint a helikáz a nukleinsav mentén egy irányban, diszkrét lépésekben halad, és minden NTP fogyasztó ciklus hozzájárul az előre haladáshoz. Az előrehaladás sebességét az ATP-áz ciklus sebesség-meghatározó lépése diktálja, mely meghatározza a DNS aktivált *steady-state* ATP-áz aktivitást. A Brown-motor esetén erős és gyenge DNS-kötő állapotok váltogatják egymást, ahol a helikáz szabadon diffundál a DNS mentén a gyenge állapotokban. Ebben az esetben az ATP-áz aktivitás és a transzlokáció lazábban kapcsolnak egymáshoz, sok esetben „felesleges” (egyirányú haladáshoz nem kapcsolt) ATP-áz ciklusok is történnek. Ezek alapján az araszoló mechanizmus megtett nukleotidoként egy vagy kevesebb ATP elfogyasztását feltételezi, míg a Brown-motor mechanizmus magasabb csatolási aránnyal dolgozik. Egy bonyolultabb kinetikai értelmezést szolgáltat az úgynevezett nem-egyforma (más néven nem-uniform) lépéseket tartalmazó modell, mely lényegében az araszoló mechanizmus egy alternatív változata. E modell szerint a transzlokáció nettó sebességét egy sebesség-meghatározó lépés uralja, mely alatt több gyors ATP-áz ciklus és több lépés is végbemehet. Ilyen mechanizmust az UvrD (9), a RecBCD (10), és az NS3 (11) helikázok esetében feltételeztek.

Szálszétválasztás kapcsán beszélhetünk passzív illetve aktív módokról (12,13). A passzív szálszétválasztás során a helikáz a hőmozgás következtében szétnyílt nukleinsav szálak közé bújik be, az aktív mód esetén pedig ténylegesen meggyengíti a bázispárok közti kapcsolatot. A dolgozat során az egyik prominens helikáz család, a RecQ helikázok két képviselőjét fogom tárgyalni mechanisztikus enzimológiai szempontból.

2. A helikáz szupercsaládok

A helikázokat a RecA illetve AAA⁺ doménekben elhelyezkedő konszenzus szekvenciák alapján hat szupercsaládba osztották (2,14). A legjobban karakterizált SF1 és SF2 szupercsaládok tagjainál két tandem RecA domén alkotja a mag domént, a bennük elhelyezkedő hét konzervált motívum nagyfokú hasonlóságot mutat. Ahogy ez fentebb már említésre került, a nukleotid-kötő zsebet a két RecA (vagy AAA⁺) domén együttesen alakítja ki. Emiatt az SF1 és SF2 szupercsaládok funkcionális egysége a monomer (emellett vannak olyanok, melyek bizonyos feladatokat oligomerként látnak el), míg a másik négy szupercsalád

tagjainál a nukleotid kötéséhez és hidrolizisához elméletileg is elengedhetetlen legalább a dimerek képződése. Ennek megfelelően a helikázok mindegyike hattagú gyűrűként vagy tizenkét tagú kettős gyűrűként funkcionális (2. ábra C panel, lásd még bővebben az „Eredmények megbeszélése” fejezetben). A legváltozatosabb csoport az SF2 szupercsalád, mely mind nukleinsav szubsztrát specificitásában, mind celluláris funkcióban változatos tagokkal képviselteti magát. Ide tartoznak többek között a „DEAD-box” RNS helikázok (15), a DNS/RNS duplexeket széttekerő hepatitisz C vírus NS3 helikáz (16-18), és a dolgozat tárgyául szolgáló RecQ család tagjai (19).



3. A RecQ család

Az SF2 szupercsaládba tartozó RecQ család helikázainak jelentőségét tükrözi, hogy minden élő szervezetben előfordulnak, prokariótáktól egészen az emberig (1,14,20-24). A család prototípusa az *E. coli* RecQ helikáz (25). Az evolúció során génduplikáció révén öt humán forma alakult ki (**3. ábra**), melyek különböző szerepek betöltésére specializálódtak.

Minden RecQ helikáz rendelkezik a helikázokra általánosságban is jellemző helikáz mag doménnel, mely a már tárgyalt két RecA-szerű doménből épül fel (**3. ábra**; bordó). Ez a régió felelős az ATP-vel és az egyszálú DNS-sel való interakcióért, ez kapcsolja a nukleotid-kötő zsebben bekövetkező konformáció változásokat a DNS-kötő régióban történő változásokhoz (2,14).

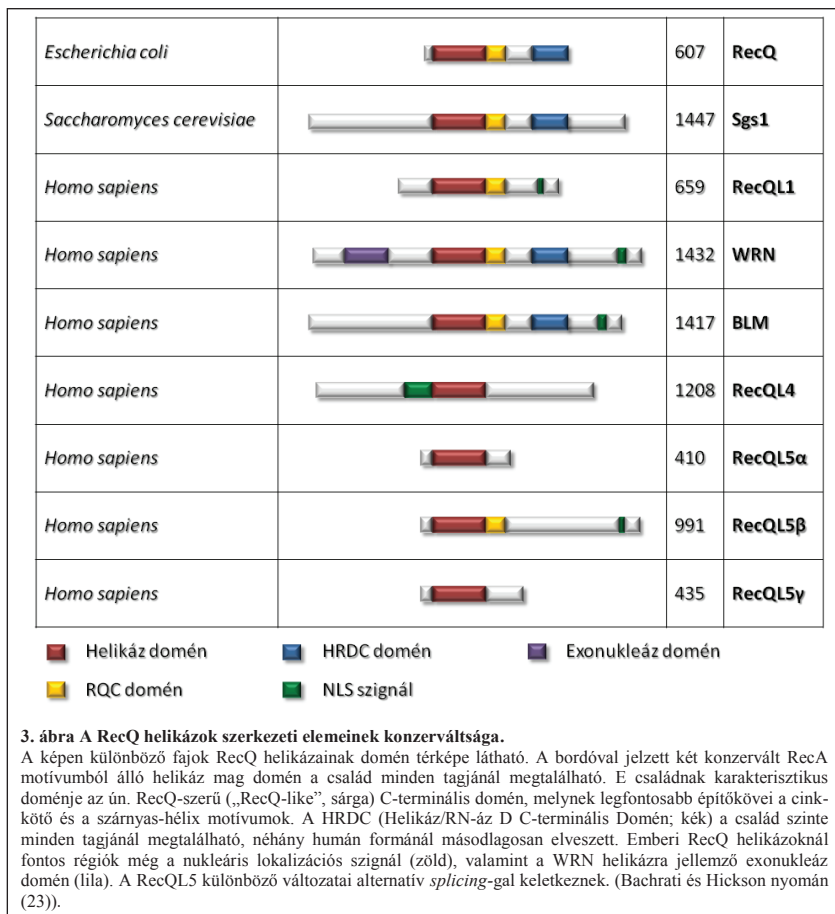
A RecQ családra specifikus régió az ún. RecQ-C-terminális (RQC) domén (**3. ábra**; sárga). Az RQC két fő összetevője a cink-kötő (melynek feltehetően jelentős szerepe van a szerkezet stabilizálásában) és a szárnyas hélix motívum (melynek kimutatták szerepét fehérje-fehérje interakciókban, pl. *E. coli* RecQ és SSB közti kapcsolat (26)). Ez a domén szinte mindegyik RecQ helikázban megtalálható, kivéve a humán RecQL4-ben, és a RecQL5 bizonyos alternatív *splice* formáiban (RecQL5 α , RecQL5 γ).

Számos RecQ helikázban szintén jelen van, bár az egyik legkevésbé konzervált domén a Helikáz/RNáz D C-Terminális domén (HRDC, (**3. ábra**; kék)), mely a molekulához flexibilisen kapcsolódik (feltehetőleg ez okozza a kristályosodási problémákat, lásd alább). Szerepe nem teljesen tisztázott, a jelenlegi nézőpont szerint szerepet játszik a specifikus DNS-szerkezet felismerésben, ezért is variábilis a különböző RecQ helikázok között. A HRDC doméneknek annotált szerepek többek között a BLM helikáz Holliday-szerkezet feloldó képessége (27,28) vagy a RecQ stabil kötődésének biztosítása részlegesen kétszálú DNS szerkezetekhez (29).

Megemlítenéd még a humán fehérjék esetén előforduló nukleáris lokalizációs szignálok (**3. ábra**; zöld), ezek játszanak szerepet a sejtmagba való szállításban, mely egy rendkívül fontos szabályozási lépést jelent a fehérjeaktivitás kívánatos megjelenése kapcsán. Például amikor nincs szükség rájuk, a BLM helikáz az úgynevezett PML (polimielitikus leukémia) nukleáris testekhez kötve helyezkedik el, míg a Werner szindróma helikáz (WRN) helikáz a sejtmagvacskához asszociált formában van jelen. A sejtciklus megfelelő fázisában, illetve a DNS-t ért bizonyos károsodások esetén ezek a fehérjék a kívánt helyre toborozódnak (23).

A WRN és ortológjai rendelkeznek egy különleges, más RecQ helikázokban nem megtalálható N-terminális 3'-5' aktivitású exonukleáz doménnel is (**3. ábra**; lila), mely a fehérje többi részétől függetlenül is funkcionális (30). Nagy valószínűséggel *in vivo* a helikáz

és az exonukleáz aktivitás koordináltan működik (31). Bizonyos munkákban a WRN exonukleáz régióinak a nem-homológ végek összekapcsolásakor (NHEJ) betöltött minőségellenőrző aktivitás során jósoltak szerepet, ahol a WRN helikáz közvetlen fehérje-fehérje interakciót létesít a Ku70/80 heterodimer DNS-függő protein kinázzal (32). Nem tisztázott még, de feltételezhető, hogy a Werner szindrómásokban jelentkező felgyorsult öregedésnek köze van az exonukleáz domén aktivitásához (illetve annak hiányához(30)).



A RecQ-család kristályszerkezetek meglehetősen hiányos képet mutatnak, DNS-kötött szerkezettel például eddig csak a RecQL1 helikázról rendelkezünk (*apo*: 2V1X, DNS-kötött: 2WWY; (33)). Azon RecQ helikázok, melyek rendelkeznek HRDC doménnel, csak *e* domén lehasítása után kristályosodnak, pl. *E. coli* RecQ helikázról eddig készültek kristályszerkezetek *apo* (1OYW; (34)) és ATPγS (nem hidrolizálható ATP analóg, 1OYY; (34), valamint a **2. ábra B panel**) formában. Számos RecQ helikáznak ismert a magányos HRDC domén szerkezete, pl. RecQ (1WUD; (35)), BLM (2RRD, 2KV2; (36,37)), WRN (2E1E; (38)). A RecQ illetve a BLM esetén a DNS-kötött atomi felbontású szerkezetek hiánya miatt a DNS kötés pontos helyére, vagy a szálszétválasztásban szerepet játszó szerkezeti elemek jelentőségére nagyrészt csak a funkcionális tesztekkel következtethetünk.

A RecQ családba tartozó helikázok fontos szerepet töltenek be a genom integritásának fenntartásában (39), főbb feladataik közé tartozik a homológ rekombináción alapuló DNS kettős száltörés információmegőrző javítása (**1. ábra**; (1,40-42)), valamint az elakadt replikációs villák stabilizálása (23,43). Ezen folyamatok emberi sejtekben betöltött szerepét jelzi, hogy az öt humán formából három funkcióvesztéses mutációja súlyos, örökletes autoszómás betegségek okozója, melyeknek közös jellemzője a változatos rákos megbetegedésekre való igen erőteljes hajlam. E fehérjék a Bloom szindrómáról elnevezett BLM helikáz (44-46), a Werner szindrómáról elnevezett WRN helikáz (30,47,48), valamint a RecQL4 helikáz, melynek egyes mutációi különböző szindrómákhoz köthetők, mint a Rothmund-Thomson (49-51), a Baller-Gerold (52) és a RAPADILINO szindróma (53). A továbbiakban bővebben a humán Bloom szindróma helikázról és az *E. coli* RecQ helikázról lesz szó.

i) A Bloom szindróma helikáz

A BLM helikáz funkcióvesztéses mutációja a már fentebb is említett Bloom szindróma okozója. A BLM-nek fontos szerepe van a HR események számának szabályozásában. A sejtbeli körülményektől függően (sejtciklus, DNS-hibák száma, foszforiláció, ubikvitináció, stb.) támogatja, illetve szuppresszálja a HR egyes lépéseit (54). Anti-rekombinációs hatásaként a HR korai, minőségellenőrzési szakaszában szétválasztja a rekombináz Rad51 nukleoprotein filamentumot (**1. ábra**). Az anti-rekombinációs hatás jelentőségét tükrözi a Bloom szindróma sejtek hiper-rekombinációs fenotípusa (44,55). Másrészről a BLM helikáz kulcsszereplő a HR-függő DNS kettős száltörés javítás azon útvonalaiban, melyek kizárólag nem átkeresztződött termékeket eredményeznek (SDSA, Holliday-szerkezet feloldás; **1. ábra**) (22,56).

További fontos jellemzője a Bloom szindróma sejteknek a replikáció problematikus lefolyása. E problémák többek között a replikációs intermedierek számának növekedése, az újonnan szintetizált DNS méretének csökkenése az eredetihez képest, valamint replikáció sebességének csökkenése (57,58). Ennek oka, hogy mikor a replikációs origó valamilyen akadályhoz érkezik (pl. léziók, hurkok, stb.), azon nem tud áthaladni és megáll. Ennek a problémának a feloldására számos útvonal alakult ki (1,23). Az egyik útvonal során az elakadt replikációs villa a HR segítségével áll helyre. Ennek során a hibás szál információmegőrző módon kijavítódik (a folyamat során az újonnan megszintetizált szál szolgál templátul) (1,23). A folyamat egyik intermediere a kettős Holliday-szerkezet, melynek átkeresztződés mentes feloldása csak a BLM jelenlétében lehetséges (1. ábra). Ma a BLM egyik legfontosabb szerepei közé sorolják az S fázisban későn replikálódó (ún. törékeny) régiók korrekt szétválásának ellenőrzését (59).

Kiemelnék még egy nemrég felfedezett jelentős kapcsolatot a Bloom szindróma és egy másik súlyos, örökletes betegség, a Fanconi anémia között (60-62). A Fanconi anémiában szenvedők fokozottan érzékenyek a DNS-keresztkötő ágensekre. Ennek oka, hogy a DNS hibát javító útvonal valamelyik résztvevője sérült. A keresztkötött DNS hibajavító útvonal egyik intermediere a kettős Holliday-szerkezet, melynek feloldásában a BLM-TopIII-Rmi1-2 komplex vesz részt, ezt a komplexet pedig a Fanconi anémia útvonal csomóponti fehérjeje a FancM toborozza a megfelelő helyre. E kapcsolat is jól szemlélteti a DNS hibajavító útvonalak komplexitását.

Biokémiai aktivitásait tekintve a BLM helikáz képes szétválasztani többek között a kettős Holliday-szerkezetet (28,42) és a D-hurkot (63,64). Ezen folyamatok során a BLM ATP-függő transzlokációt, szálszétválasztást és ún. kereszt hídvándoroltatást („branch migration”) végez.

ii) Az Escherichia coli RecQ helikáz

A RecQ helikáz kiütésének az *E. coli* sejtre kevésbé van látványos hatása, mint a BLM elvesztésének az emberi sejtekre. Az eddigi legjelentősebb fenotípus az illegitim rekombinációs események számának drámai emelkedése (65), mely jól tükrözi az evolúciós kapcsolatot a BLM helikázzal, melynek egyik alapvető feladata az illegitim rekombináció szuppressziója. Az *E. coli* RecQ enzimműködésének megértése mégis alapvető fontosságú, hiszen ez az enzim a család prototípusa, így mind evolúciós, mind enzimológiai szempontból fontos információkat nyerhetünk.

Az illegitim rekombináció szupressziója mellett a RecQ helikáz *in vivo* szabályozza a HR közvetítette kettős száltörés javítást egyrészt a HR iniciációja (pl. szabad 3' vég generálása a RecJ exonukleázal karöltve), másrészt a rekombinációs intermedierek feldolgozása révén (23,66). Ezek mellett a RecFOR útvonal résztvevőjeként szintén szerepe van az elakadt replikációs villák stabilizálásában (67-69).

A DNS aktiválja a RecQ ATP-áz aktivitását, valamint az ATP hidrolízis a szálszétválasztáshoz kapcsolt folyamat (25,70-72). A RecQ-val kapcsolatos kinetikai vizsgálatok mindeztidáig a szálszétválasztó aktivitásra koncentráltak (73-75). A RecQ helikáz szubsztrátok tekintetében promiszkuusabb, mint a humán helikázok, melyek specializálódtak az egyes biológiai funkciók betöltésére. Így a RecQ képes szétválasztani többek között a szárnyas duplexet, a tompa végű duplexet, a D-hurkot vagy a Holliday-szerkezetet (66).

iii) A RecQ és BLM mechanisztikus megismerésének motivációja

A RecQ helikázok biológiai funkciói széles körben kutattak (23,25,27,28,40,56,63,64,66,70,71,76-78), ám a molekuláris működési mechanizmusuk még mindig kevésbé értett.

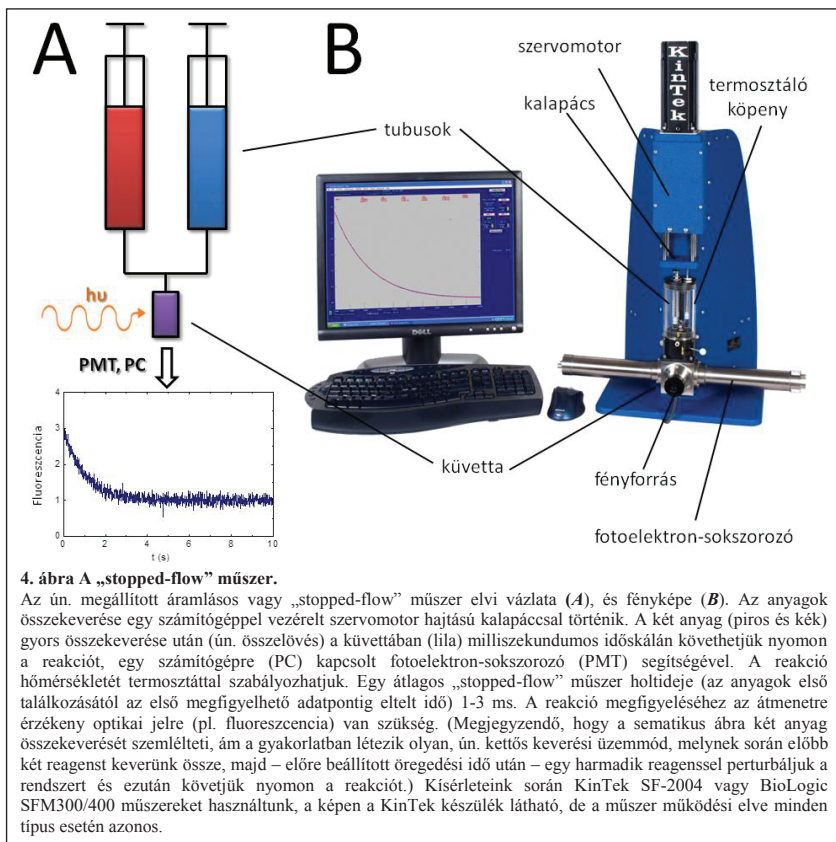
Más helikázok ATP-áz ciklusáról készültek részletes kinetikai munkák, úgy mint az SF1 szupercsaládba tartozó Rep-ről (79,80), PcrA-ról (81), vagy az SF2-be tartozó DbpA-ról (82). Szintén rendelkezünk mechanisztikus információval az UvrD (83) és az NS3 (84,85) helikázok ATP-áz ciklusáról. Emellett születtek mechanisztikus modellek a PcrA (6), az UvrD (7) (9) az NS3 (8) (11) és a RecBCD (10) helikázok transzlokációjáról. Viszont egy egységes modell, mely a transzlokációt valamint az ATP-áz ciklus DNS-interakcióval való kapcsoltságát összefoglalja még mindig várat magára.

Az ssDNS menti ATP-függő transzlokáció olyan komplexebb aktivitások megértésének alapjául szolgál, mint a kétszálú DNS szétválasztása, a kereszthíd-vándoroltatás, vagy a kettős Holliday-szerkezet feloldása (13). Ezen felül az ssDNS menti transzlokáció önmagában is esszenciális a DNS hibajavításban *in vivo*. A HR minőségellenőrzési fázisának egyik fontos lépése a Rad51 rekombinááz nukleoprotein filamentum aktív szétszedése (1. ábra). Ezen aktivitásnak az alapja a BLM ssDNS menti transzlokációja. Ennek jelentőségét már az élesztőben is kimutatták, az ortológ Srs2 helikáz katalizálja a Rad51 filamentum lebomlását (86). Továbbá az ssDNS menti transzlokáció valószínűleg a hatékony *in vivo* szálpárosításhoz is esszenciális.

III. Metodikai összefoglaló

1. A stopped-flow módszer

A megállított áramlásos, vagy „stopped-flow” módszer elve, hogy két (vagy három) anyagot gyorsan összekeverünk, így megfigyelhetjük a reakció *pre-steady-state* kinetikáját. E módszerrel olyan, más egyensúlyi vagy *steady-state* módszerekkel nem elérhető információhoz jutunk, mely lehetővé teszi a rendszer molekuláris működésének mélyebb megértését. Technikailag egy számítógép vezérlésű szervomotorhoz kapcsolt kalapács összelöki a reaktánsokat, melyek egy keverőn át a küvettába jutnak (4. ábra), kilökve belőle az előző lövésből származó, „öreg” oldatot, majd egy úgynevezett „stop” tubus megállítja az



áramlást. A küvettában a folyamat során bekövetkező optikai jelváltozást egy fotoelektron-sokszorozó (PMT) felerősíti, majd a jelet a számítógép felé továbbítja, ahol nyomon követhető a reakció. A keveréstől a küvettába jutásig eltelt idő okozza a készülék holtidejét, mely 1-3 ms között változik. Az optikai változás lehet fluoreszcencia, fényszórás, vagy transzmittancia/elnyelés változás, két PMT együttes használata lehetővé teszi ezek együttes megfigyelését is. A reakció hőmérsékletét egy vízforgatásos termosztát szabályozza, mely köpenyként beburkolja a reagenseket tartalmazó tubusokat.

A *pre-steady-state* vagy tranzien্স kinetikai mérések során előnyös olyan reakciókörülmények között végezni a kísérleteket, hogy a reakció időbeli lefutását exponenciális függvénnyel, vagy exponenciálisok és lineáris függvények összegével modellezhessük. Ellenkező esetben az adatok analízise csak bonyolult kinetikai modellezéssel oldható meg. Ennek érdekében lehetőség szerint elsőrendű reakciókat (disszociáció, izomerizáció, stb.) figyelünk meg. Másodrendű reakciók megfigyelésekor igyekszünk olyan ún. pszeudo-elsőrendű kísérleti körülményeket teremteni, ahol az egyik reaktáns nagy feleslegben van, így koncentrációja állandónak tekinthető a reakció során. Ebben az esetben szintén alkalmazhatjuk az exponenciális közelítést a reakció elemzésére (Bővebben lásd még: (87,88)).

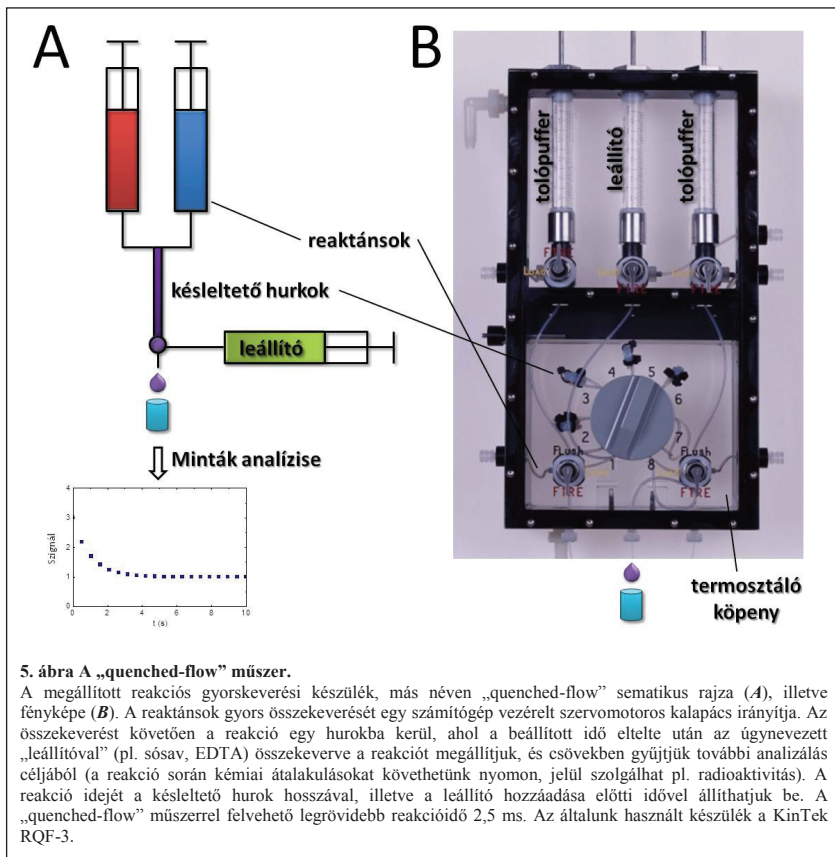
2. A quenched-flow módszer

A megállított reakciós gyorskeverési (vagy más néven „quenched-flow”) módszer lehetővé teszi olyan reakciók *pre-steady-state* kinetikájának megfigyelését, melyek végtermékei a reakció után azonosíthatók. Ilyen például az enzimek általi ATP hidrolízis. Ebben az esetben a reakció nem követhető nyomon valós időben, hanem a reakció különböző időpontokban történő leállítása után, a keletkezett termékek analízise révén nyerhetünk információt a reakció kinetikájáról.

Technikailag, egy gépileg vezérelt szervomotor összekeveri a reagenseket, melyek egy ún. késleltető hurokba kerülnek, majd a beállított idő leteltével hozzákeveri a reakcióhoz a leállító oldatot (általában ez sósav vagy EDTA (Etilén-diamin-tetraecetsav)), és a megfelelő gyűjtőcsőbe juttatja az elegyet, mely ezután analízálható. A reakcióidő egyrészt a késleltető hurok hosszával, másrészt várakozási idővel szabályozható. A reakció hőmérséklete vízkeringéses termosztátáló köpönnyel szabályozható, mely körülöleli a reagenseket tartalmazó hurkokat és a reakcióteret.

E technika használatakor leggyakrabban valamilyen radioaktív jelet alkalmazunk (pl. ^{32}P - γ -ATP, ^{32}P -jelölt DNS, ^3H , stb.). A sósavval illetve EDTA-val leállított reakciók között

különbséget jelent, hogy a sósav az egész rendszert denaturálja, így az enzimműködött, és az enzimműködött már felszabadult termékek nem különböztethetők meg. Ezzel szemben az EDTA oly módon állítja meg a reakciót, hogy elvonja a legtöbb ATP-áz enzim működéséhez szükséges kétértékű ionokat (pl. Mg^{2+}). Ennek segítségével bizonyos esetekben az enzimműködött és már felszabadult termékek elválaszthatóak. A reakciók elemzésére vonatkozó megfontolásokat lásd: (87,88).



CÉLKITŰZÉSEK

Célunk volt a RecQ és BLM helikázok molekuláris működésének megértése, bővebben annak felderítése, hogy az ATP-áz ciklus egyes lépései hogyan kapcsolnak a DNS-sel történő interakcióval, és mindez hogyan és milyen mechanizmussal eredményez processzív transzlokációt a DNS-sín mentén. Ennek érdekében a következő lépéseket tettük:

- Lépésenként megvizsgáltuk a RecQ és a BLM ATP-áz ciklusát, valamint a DNS ezekre gyakorolt hatását.
- Részletesen vizsgáltuk a RecQ DNS-sel való kölcsönhatásának kinetikáját különböző nukleotid állapotokban.
- Kidolgoztunk egy általános módszert bármely NTP-függő nukleinsav mentén mozgó motorfehérje transzlokációjának karakterizálására.
- A fentebb említett, valamint más kiegészítő módszerekkel karakterizáltuk a RecQ és a BLM egyszálú DNS menti transzlokációját.
- Globális kinetikai modellezéssel validáltuk a RecQ helikáz kísérletes adatok alapján kidolgozott mechanokémiai működési modelljét.

EREDMÉNYEK

I. Általános módszer nukleinsav motorok mozgásának karakterizálására

Ennek a fejezetnek az alapjául a „Streamlined determination of processive run length and mechanochemical coupling of nucleic acid motor activities.” (Gyimesi, M, Sarlós, K, Derényi, I, Kovács, M (2010) *Nucleic Acids Res* 38:e102., továbbiakban: (89)) publikációnk szolgált.

Munkánk során kidolgoztunk egy általános, bármely nukleinsav sín mentén mozgó NTP-áz enzim mechanizmusának leírására alkalmas módszert, melynek segítségével tranziens kinetikai mérések analiziséből mechanisztikus paramétereket határozhatunk meg.

A motorok többsége preferált irányban mozog a szerkezetileg poláris sín mentén („+” illetve „-” vég a citoskeletális filamentumok esetén, és 3'- vagy 5'- vég a nukleinsavak esetén). A motorok megoszlának a tekintetben, hogy preferáltan kötnek-e a filamentum valamelyik végéhez, esetleg random módon, bárhol képesek a sínhez kötődni. Ahhoz, hogy az általunk kidolgozott analízist alkalmazni tudjuk, más független mérések során információt kell szereznünk az általunk vizsgált NTP-áz ezen két tulajdonságáról, a direkcionálisról és a kötési preferenciákról.

Ezen tulajdonságok mellett a funkcionálisan legjelentősebb paraméterek a makroszkopikus transzlokációs sebesség (k_{trans} , sínhossz egységeiben definiálva, pl. időegység alatt megtett nukleotidok), a transzlokáció alatti ATP-áz aktivitás ($k_{\text{ATP,trans}}$, s^{-1}), ezt a két mennyiséget összekapcsoló mechanokémiai kapcsoltsági arány (C , egységnyi út megtételéhez szükséges NTP molekulák száma enzimenként) (**1. táblázat**). Fontos kulcsparaméter még a processzivitás, vagyis a motor azon képessége, hogy több, egymás utáni mechanokémiai ciklust tegyen a sínről való leválás nélkül. Kvantitatívan a processzivitás (P) a következő transzlokációs ciklus megtételének valószínűségéként fejezhető ki (**1. táblázat**).

A fenti paraméterek a motor molekuláris kinetikai mechanizmusából eredeztethetők, amelyet több kísérleti és analitikai megközelítéssel vizsgáltak (8,10,86,90-98). A továbbiakban egy olyan általunk kifejlesztett modern analitikai módszert mutatok be, mely labortechnikailag könnyen elérhető fix hosszúságú oligonukleotidok, és jól beállított NTP hidrolízis szenzorok alkalmazására épül. Ezt az analízist alkalmazva a motor aktivitás minden kulcsfontosságú makroszkopikus paraméterét egyszerű kísérletek során, nagy pontossággal meghatározhatjuk.

1. A módszer bemutatása

i) Az NTP-fogyasztás sínhossz függése egy processzív futás alatt

A processzivitás (P) a következő transzlokációs lépés megtételének valószínűségeként definiálható. A disszociáció valószínűsége $1-P$ minden transzlokációs lépés során. Annak a valószínűsége ($p(n)$), hogy a motor végtelen hosszú sín mentén egy n lépésből álló futást tesz meg:

$$p(n) = (1-P)P^n \quad 1. \text{ egyenlet}$$

Következésképpen végtelen hosszú sín mentén az átlagosan megtett lépések száma ($\langle n \rangle$) egyszeri futás során P processzivitás esetén az alábbi lesz:

$$\langle n \rangle = \sum_{n=0}^{\infty} np(n) = \frac{P}{1-P} \quad 2. \text{ egyenlet}$$

Véges hosszú sín esetén a szál végéről indulva (mely N lépés megtételét engedélyezi) az egyszeri futás során átlagosan megtett lépések száma ($\langle n_{\text{end}}(N) \rangle$) kisebb lesz, mint $\langle n \rangle$, mert az enzimek azon része, mely eléri a szál végét ($q_{\text{end}}(N) = P^N$), nem folytathatja útját. Így azon lépések várható száma, melyeket innentől még megtennének végtelen sín esetén (ami szintén $\langle n \rangle$) levonandó:

$$\langle n_{\text{end}}(N) \rangle = \langle n \rangle - q_{\text{end}}(N) \langle n \rangle = \frac{P}{1-P} (1 - P^N) \quad 3. \text{ egyenlet}$$

Abban az esetben, ha a futás random pozícióból indul (az enzim előtt r lépést hagyva, mely 0 és N között egyenletesen oszlik el), a véget elérő enzim molekulák hányada a következő lesz:

$$q_{\text{rand}}(N) = \frac{1}{N+1} \sum_{r=0}^N P^r = \frac{1}{N+1} \frac{1-P^{N+1}}{1-P} \quad 4. \text{ egyenlet}$$

így az egyszeri futás alatt átlagosan megtett lépések száma ($\langle n_{\text{rand}}(N) \rangle$) így alakul:

$$\langle n_{\text{rand}}(N) \rangle = \langle n \rangle - q_{\text{rand}}(N) \langle n \rangle = \frac{P}{1-P} \left(1 - \frac{1}{N+1} \frac{1-P^{N+1}}{1-P} \right) \quad 5. \text{ egyenlet}$$

A **3. egyenletben**, a **4. egyenletben**, és az **5. egyenletben** a sín szabad hossza (N) az enzim által megtett lépésekben van kifejezve. Gyakorlati szempontból előnyösebb a sín teljes hosszát (L) nukleotid egységekben kifejezni, melyen az enzim b kötőhely méretnyi szakaszt foglal el (szintén nt egységekben kifejezve, ez az a minimum sínhossz, amihez az enzim már képes erősen kötődni, ám nem képes rajta transzlokálni, **1. táblázat**). A transzlokáció kinetikai lépése általában két egymást követő sebesség meghatározó esemény közti mechanokémiai ciklusok sorozataként van definiálva. Eszerint N megegyezik $(L-b)/m$ -mel, ahol m a kinetikai lépésméret egy kinetikai lépés során átlagosan megtett nukleotidok száma. A csatolási sztöchiometriát (kinetikai lépésenként átlagosan elhidrolizált NTP-k száma) c -vel jelölve, egy egyszeri, processzív futás során az NTP fogyasztás amplitúdóját (mol NTP/mol enzim) így fejezhetjük ki

$$A_{\text{end}}(L) = c \frac{P}{1-P} (1 - P^{(L-b)/m}) \quad 6. \text{ egyenlet}$$

ha a futás a szál egyik végétől indul (a **3. egyenlet** alapján), és

$$A_{\text{rand}}(L) = c \frac{P}{1-P} \left(1 - \frac{1}{(L-b)/m+1} \frac{1 - P^{(L-b)/m+1}}{1-P} \right) \quad 7. \text{ egyenlet}$$

ha a futás random pozícióból indul (az **5. egyenlet** alapján).

Ha P egyhez közelít ($P > 0,9$, ami a legtöbb gyakorlati esetben releváns szituáció), a **6. egyenlet** és **7. egyenlet** nem elegendő c és m független feloldására, mert A túlnyomó részt a hányadosuktól $C = c/m$ fog függeni, mely értéket gyakran mechanokémiai kapcsoltsági hányadosnak neveznek (megtett nukleotid egységenként átlagosan elhidrolizált NTP molekulák száma) (**1. táblázat**). Gyakorlati okokból a továbbiakban az értékeket mesterségesen beállítjuk $c = 1$ -nek (így $m = 1/C$). Ezt a választást az is motiválja, hogy a legtöbb processzív enzim egy lépés megtételéhez egy NTP-t hidrolizál el. Ezek alapján a **6. egyenlet** és a **7. egyenlet** a következő formát ölti:

$$A_{\text{end}}(L) = \frac{P_{\text{macr}}}{1 - P_{\text{macr}}} (1 - P_{\text{macr}}^{C(L-b)}) \quad 8. \text{ egyenlet}$$

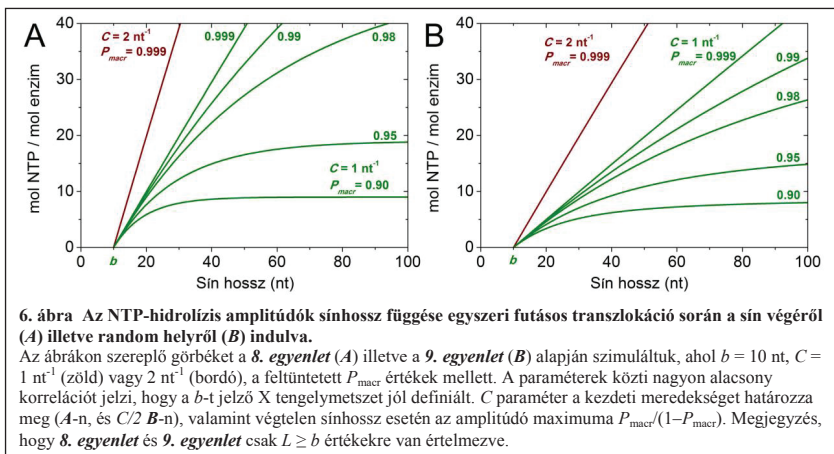
a sín végéről induló futások esetén, és

$$A_{\text{rand}}(L) = \frac{P_{\text{macr}}}{1 - P_{\text{macr}}} \left(1 - \frac{1}{C(L-b)+1} \frac{1 - P_{\text{macr}}^{C(L-b)+1}}{1 - P_{\text{macr}}} \right) \quad 9. \text{ egyenlet}$$

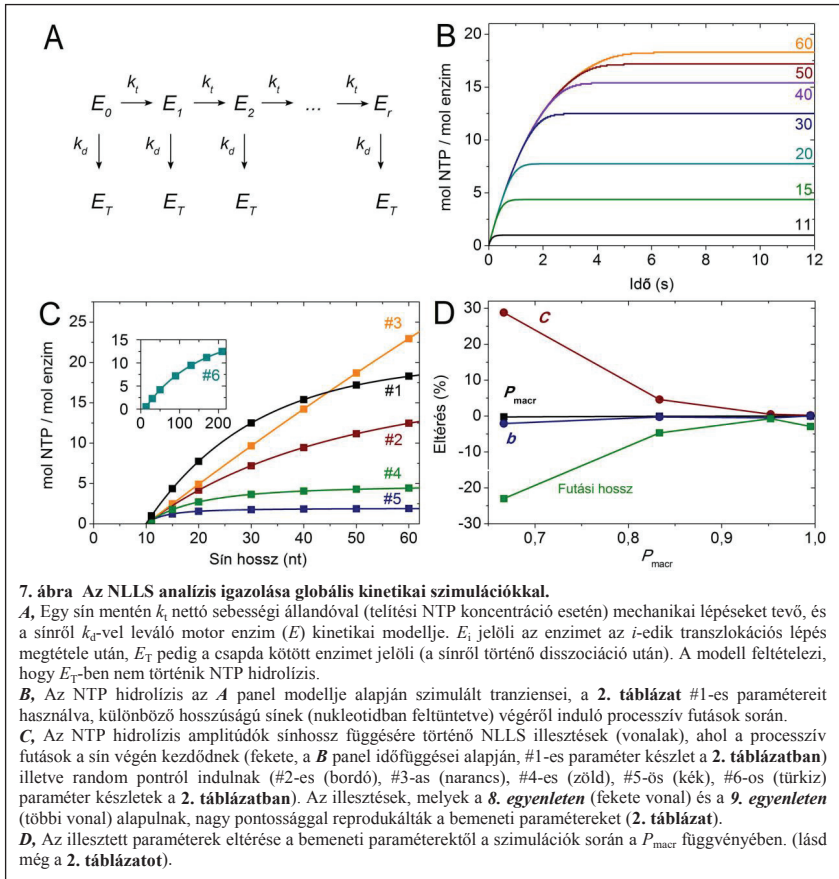
random pozícióból induló futások esetén. Fontos megemlítenünk, hogy az egyszerűsített formulában szereplő processzivitás a **8. egyenletben** és a **9. egyenletben** (ami a makroszkopikus processzivitás, P_{macr} -ként jelölve) különbözni fog a mikroszkopikus kinetikai processzivitás P értékétől, abban az esetben ha c nem egyezik meg eggyel. A kétféle processzivitás közti összefüggést az a feltétel adja, hogy mindkettő ugyanazt az átlagos futási hosszt reprodukálja (lásd még **1. táblázat**):

$$\frac{1}{C} \frac{P_{\text{macr}}}{1 - P_{\text{macr}}} = m \frac{P}{1 - P} \quad 10. \text{ egyenlet}$$

A **8. egyenlet** és **9. egyenlet** a legkisebb négyzetek módszere (NLLS) alapján függvényként illeszthető az egyszeri futások körülmények közti NTP hidrolízis amplitúdók sínhossz függésének analiziséhez (**6. ábra** és **7. ábra**). Ezeket a kísérleteket tipikusan gyorskeveréses műszerekkel (stopped-flow, quenched-flow) végezzük, oly módon, hogy az egyik tubusban lévő enzim és sín keverékét a másik tubusban lévő NTP-vel (telítési koncentráción) és fehérje csapdával összekeverjük. A fehérjecsapda feladata, hogy az enzim visszakötését egy másik sínmolekulához a transzlokációs ciklus befejezése után megakadályozza, biztosítva ezáltal az egyszeri futást. A hidrolízis termékek megjelenésének időbeli nyomon követése lehetséges az anorganikus foszfát (P_i) megkötésére jelet adó fluoreszcens fehérjével (MDCC-PBP (99)), vagy radioaktívan jelölt (pl. γ - ^{32}P -) NTP-vel.



Ezen időfüggések során a kezdeti gyors fázis az enzim transzlokációja alatti NTP hidrolízishez köthető, melyet egy lassabb termékmegjelenés követ, ami a csapda-kötött enzimmolekulák általi NTP hidrolízisből ered. A transzlokációs fázis amplitúdója a két fázis lineáris metszéspontjából meghatározható. Az amplitúdók elemzése mellett a transzlokációs fázis meredekségéből számolható a transzlokáció alatti *steady-state* NTP-áz aktivitás ($k_{\text{ATP,trans}}$, **1. táblázat**), valamint a makroszkopikus transzlokációs sebesség ($k_{\text{trans}} = k_{\text{ATP,trans}}/C$, **1. táblázat**), melyek általában függetlenek a sínhossztól.



A **6. ábra** példákat mutat az NTP-fogyasztás időbeli lefutására egyszeri futásos transzlokáció során. A **8. egyenlet** mely a végről induló futásokat írja le, használható például kettős szálú (ds) DNS széttekerésének vizsgálatára, ahol az enzim egy egyszálú (ss) rövid szakaszcól indul (**6. ábra A panel**). Sok transzlokáz köt random módon a sínhez (9,86,90,91,93,100,101). Ezeknek az eseteknek az elemzésére a **9. egyenlet** által definiált modell alkalmas (**6. ábra B panel**). A három változó, mely a modellekben szerepel, nagyon alacsony korrelációt mutat, ami rendkívül előnyös pontos meghatározhatóságuk szempontjából (**6. ábra** szöveg).

Hogy igazoljuk a módszerünk pontosságát, az NTP hidrolízis időbeli lefutásait szimuláltuk végpreferencia és random startpozíció esetén, modellként a **7. ábra A paneljén** látható kinetikai sémát alkalmazva. Az NTP fogyasztás szimulált görbéihez (**7. ábra B panel**) tartozó amplitúdók sínhossz függése az **8. egyenletet** és **9. egyenletet** illesztettük (**7. ábra C panel**). Az illesztések a bemeneti paramétereket nagy pontossággal reprodukálták (**7. ábra D panel; 2. táblázat**).

ii) *A „haszontalan”, nem transzlokáló NTP-áz ciklusok hatása az NTP fogyasztás amplitúdóira*

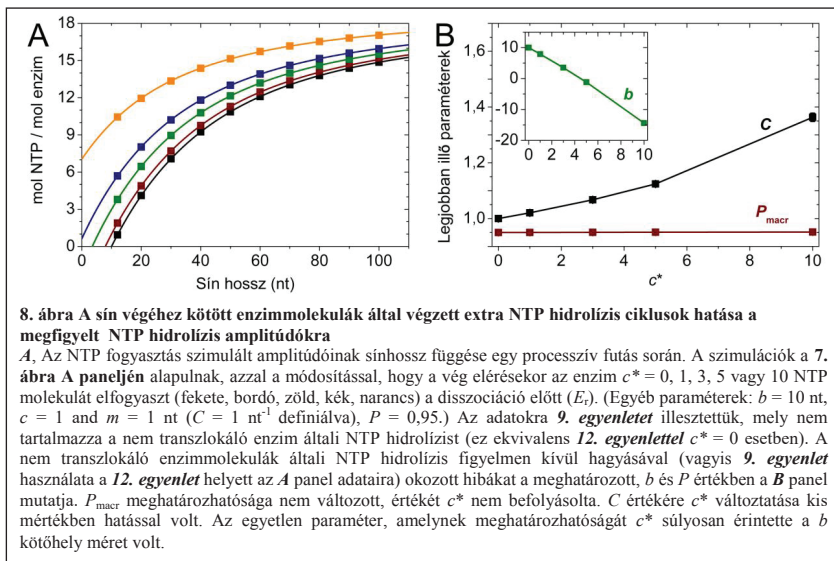
A sín végének elérésekor, a transzlokáció befejezése után lehetnek olyan enzim molekulák, melyek kötve maradnak huzamosabb ideig és „felesleges” NTP-áz ciklusokat végeznek a leválás előtt (90,91). Ennek a jelenségnek szignifikáns hatása lehet az NTP fogyasztás **8. egyenlet** és **9. egyenlet** által definiált amplitúdóira. Ha c^* -ot az enzim által leválás előtt a szálvégen átlagosan elhidrolizált extra NTP molekulákként definiáljuk ($c^* = k_{\text{ATP, end}}/k_{\text{off, end}}$ ahol $k_{\text{ATP, end}}$ a szálvég kötött nem transzlokáló molekulák NTP hidrolízisének nettó sebességi állandója, $k_{\text{off, end}}$ pedig az enzim szálvégről történő leválásának nettó sebességi állandója), akkor a **8. egyenletet** és a **9. egyenletet** ki kell egészíteni $c^* \cdot q_{\text{end}}(N)$ -el és $c^* \cdot q_{\text{rand}}(N)$ -el, ami a következő összefüggésekhez vezet:

$$A_{\text{end}}(L) = \frac{P_{\text{macr}}}{1 - P_{\text{macr}}} \left(1 - P_{\text{macr}}^{C(L-b)} \right) + c^* P_{\text{macr}}^{C(L-b)} \quad 11. \text{ egyenlet}$$

végről induló futások esetén, és

$$A_{\text{rand}}(L) = \frac{P_{\text{macr}}}{1 - P_{\text{macr}}} \left(1 - \frac{1}{C(L-b)+1} \frac{1 - P_{\text{macr}}^{C(L-b)+1}}{1 - P_{\text{macr}}} \right) + c^* \frac{1}{C(L-b)+1} \frac{1 - P_{\text{macr}}^{C(L-b)+1}}{1 - P_{\text{macr}}} \quad 12. \text{ egyenlet}$$

random helyről induló futások esetén. Ellentétben a **8. egyenlettel** és a **9. egyenlettel** melyekben a változók nem kovariánsak (P_{macr} , C és b – emiatt pontosan meghatározhatók), c^* bevezetése szignifikáns paraméter kovarianciát eredményez az illesztések során. Ez a jelenség limitálja a **11. egyenlet** és a **12. egyenlet** alkalmazhatóságát a kísérletes adatokra. Emiatt megvizsgáltuk a nem transzlokáló molekulák általi NTP hidrolízis miatti, a **9. egyenlet** alapján meghatározott paraméterekben okozott hibát. Úgy találtuk, hogy C és P_{macr} a **9. egyenlet** alapján viszonylag nagy pontossággal meghatározható még magas c^* értékek esetén is, amikor a véghez kötött molekulák általi NTP fogyasztás megközelíti a transzlokáció alattit (**8. ábra**). b paraméter az egyetlen, ami nem határozható meg megbízható módon nem transzlokáló molekulák általi NTP hidrolízis jelenlétében. Összességében elmondható, hogy a **8. egyenlet** és a **9. egyenlet** a C és P_{macr} paraméterekre még nem transzlokáló molekulák általi jelentős NTP hidrolízis mellett is (c^*) megbízható értékeket ad, míg a **11. egyenlet** és a **12. egyenlet** használható c^* meghatározására, ha a kötőhely méretet (b) más, független módszerrel már megismertük.



iii) A fehérjecsapda hatása a processzivitásra

A heparin és a dextrán szulfát (DxSO₄) széles körben elterjedt fehérjecsapda egyszeri futásos körülmények generálásához, ahol a motor leválás után nem képes visszakötni a sínhez (9,93,94,100-102). A heparin és a DxSO₄ rendelkezik azzal az előnyös tulajdonsággal, hogy a nukleinsav sinnel ellentétben nem, vagy csak sokkal kisebb mértékben aktiválja a nukleinsav motorok ATP-áz aktivitását. Azonban a processzivitásra hatást gyakorolnak főként azért, hogy a k_d -t megnövelik, de elméletileg hatással lehetnek k_t -re is (lásd **7. ábra, A panel**). Ezen körülmények között a mért processzivitás értékek ($P = k_t / (k_t + k_d)$) függeni fognak a csapda koncentrációtól ($[T]$) a következő módon:

$$P([T]) = \frac{K_d' + [T]}{\frac{K_d'}{P_0} + \frac{[T]}{P_T}} \quad 13. \text{ egyenlet}$$

ahol P_0 és P_T a nulla és a telítési csapdakonzentrációhoz tartozó processzivitás értékek, és K_d' a csapda motorhoz kötődésére jellemző látszólagos disszociációs állandó (ugyanabban az egységben kifejezve, mint $[T]$; $K_d' = K_d(k_t^0/k_t^T)$), ahol K_d a transzlokáció alatt a csapda motorhoz való kötődésének nettó disszociációs állandója, és k_t^0 és k_t^T a csapdamentes és a telítési csapdakonzentráció melletti transzlokáció nettó sebességi állandói. A P értékek meghatározásából különböző csapdakonzentrációk mellett tehát kiszámíthatjuk a csapdamentes állapotra jellemző processzivitás értéket (P_0). A **13. egyenlet** érvényes a kinetikai (P) és a makroszkopikus (P_{macr}) processzivitás értékekre is.

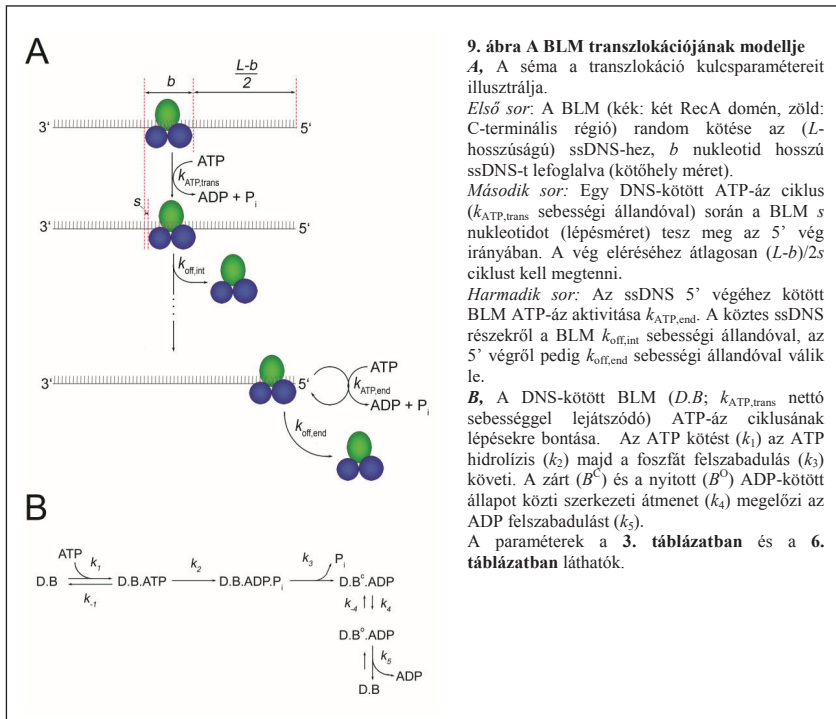
iv) A modell validálása

A modellben szereplő egyenletek használhatóságát a fentebb bemutatott kinetikai séma alapján végrehajtott numerikus szimulációk segítségével validáltuk (**7. ábra B-C panel, 2. táblázat**), random starthely és preferenciális végkötés esetén. A k_t , k_d és C paramétereket variáltuk, hogy teszteljük az illesztések pontosságát (**7. ábra C-D panel, 2. táblázat**). Az illesztések robusztusságát szemlélteti, hogy a P_{macr} és b illesztett paraméterek számos bemeneti k_d és k_t érték mellett nagy pontossággal meghatározhatók voltak, melyek széles eloszlású processzivitási skálát definiálnak (0,66667 és 0,99502 között) (**7. ábra D panel, 2. táblázat**). $P_{\text{macr}} < 0,7$ esetén C meghatározása nehezebb $\langle n \rangle$ alacsony értéke miatt, ugyanakkor az analízis pontossága még mindig elfogadható. Ezzel ellentétben $P_{\text{macr}} \geq 0,83$ értéktartományban (ami $\langle n \rangle \geq 5$ értéket eredményez, a legtöbb biológiai motor nagy többségére jellemző módon), a C érték bizonytalansága kisebb, mint 5 % (**7. ábra D panel, 2.**

táblázat), ami összemérhető az átlagos kísérleti bizonytalansággal. Azt is igazoltuk, hogy P_{macr} és b pontosan meghatározható abban az esetben is, amikor C nagymértékben különbözik egytől (7. ábra C panel betét, 2. táblázat #6-os paraméterkészlet). A b bemeneti paraméter változtatása csak horizontális eltolódást okoz, így nem befolyásolja döntően az illesztett paramétereket.

II. A Bloom szindróma helikáz karakterizálása

Ennek a fejezetnek az alapjául a „Processive translocation mechanism of the human Bloom's syndrome helicase along single-stranded DNA.” (Gyimesi, M, Sarlós, K, Kovács, M (2010) *Nucleic Acids Res* 38:4404-4414., továbbiakban: (103)) publikációnk szolgált.



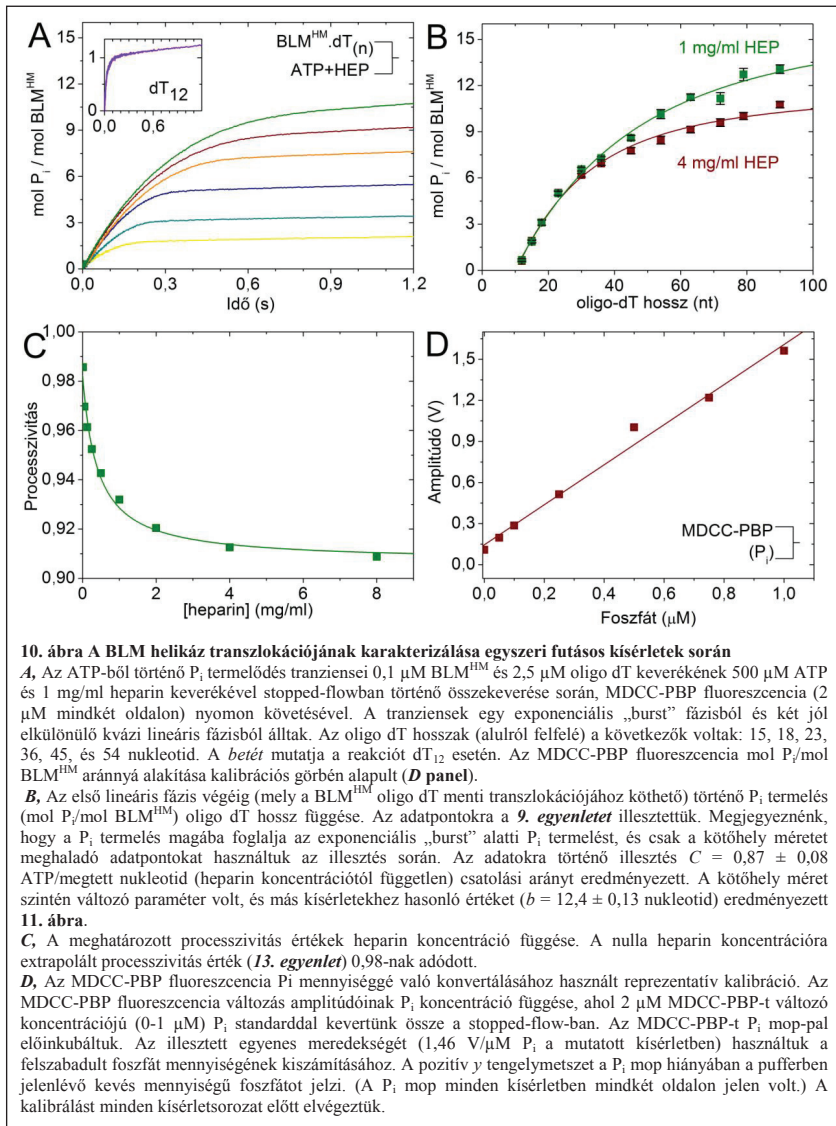
A BLM helikáz működési mechanizmusát egyensúlyi, *steady-state* és tranziens kinetikai módszerekkel karakterizáltuk. A 9. ábra **A paneljén** a BLM helikáz transzlokációjának modellje látható, az **1.1** fejezetben tárgyalt modellben szereplő paraméterek feltüntetésével (lásd még: **6. táblázat**). Egyensúlyi fluoreszcencia spektroszkópiai mérésekkel kimutattuk, hogy a BLM random módon köt az egyszálú DNS-hez (103). Ezt az információt felhasználva karakterizáltuk a BLM ssDNS menti transzlokációját egyszeri futásos és *steady-state* kísérletekkel, melynek részleteit az alábbi fejezetekben tárgyalom. A **9. ábra B paneljén** a BLM helikáz DNS-kötött ATP-áz ciklusának kinetikai sémája látható, melyet a tranziens és *steady-state* kinetikai eredmények alapján dolgoztunk ki. A modellben definiált kinetikai paraméterek a **3. táblázatban** szerepelnek. Az ATP-áz ciklus részleteire a dolgozat nem terjed ki, az „Eredmények megbeszélése” fejezetben a ciklus fő jellemzőit hasonlítom össze a RecQ helikáz ATP-áz ciklusával (lásd: **61. oldal**).

1. Egyszeri futásos kísérletek

Az adatok egyszerűbb értelmezése érdekében a kísérletekben a BLM helikáz egy rövidített változatát használtuk (642-1290 aminosavak), mely az *E. coli* RecQ helikázzal homológ doméneket tartalmazza, (ún. „helikáz modul”, vagyis BLM^{HM}). A BLM^{HM} a teljes hosszúságú BLM szinte minden aktivitásával rendelkezik, alkalmazásának előnye, hogy bizonyítottan monomer, így a kísérletek értelmezésekor feltételezhetjük, hogy egy darab aktív ATP-áz/transzlokáz egység foglal helyet egy DNS molekulán (27).

Az egyszeri futásos körülmények biztosításához heparint használtunk fehérjecsapdaként. A heparinnak nincs ATP-áz aktivitása, és a DNS-mentes BLM^{HM} ATP-áz aktivitását csak két és félszeresére gyorsítja (103). A BLM^{HM}-et különböző hosszúságú telítési koncentrációjú oligo dT-vel előinkubáljuk, majd gyorsan összekeverjük telítési koncentrációjú ATP-vel és heparinnal. A stopped-flowban az MDCC-PBP fluoreszcenciát nyomon követve a foszfát felszabadulás többfázisú tranzienseit figyelhetjük meg. A kötőhely méreténél hosszabb DNS szubsztrátok esetén a tranziensek egy gyors exponenciális „burst”-ből és két jól elkülönülő kvázi lineáris fázisból álltak, míg dT₁₂ esetén az első gyors lineáris fázis hiányzott **10. ábra A panel**. Az exponenciális amplitúdója megegyezett az egy enzimenkénti egy ATP molekula *pre-steady-state* hidrolíziséből származó foszfáttal ($A_{burst} = 1,1 \pm 0.1 \text{ mol P}_i/\text{mol BLM}^{HM}$). Ez az eredmény összhangban van azzal a korábbi, foszfát-felszabadulással kapcsolatos megfigyelésünkkel (heparin távollétében), miszerint ez a lépés megelőzi a sebesség meghatározó lépést, és enzimolekulánként egy ATP hidrolízise történik az első ciklus során

(lásd még: (103)). Így az exponenciális fázis az első, *steady-state* beállta előtti ATP-áz ciklus alatti ATP hidrolizist reprezentálja DNS-kötött állapotban.



Az első lineáris fázisból számított ATP átviteli sebességek függetlenek voltak az oligo dT hosszától (12 nukleotid fölött; $27 \pm 2 \text{ s}^{-1}$). Ezen fázis amplitúdója az oligo-dT hosszal nőtt (**10. ábra A-B panel**), a transzlokáció alatti ATP fogyasztást reprezentálván. Az adatok analizését a 9. egyenlet alapján végeztük. A kísérletet több különböző heparin koncentráción végeztük (**10. ábra B panel**). A processzivitás értékek a korábban (I.1.iii) fejezet) leírtak alapján függtek a heparin koncentrációtól (**10. ábra C panel**), az adatokra a 13. egyenletet illesztettük. A nulla heparin koncentrációra extrapolált processzivitás $P = 0,98$ (a transzlokációs lépés valószínűségként kifejezve) volt, mely $(P/(1-P)) = 50$ átlagos lépést eredményezett futásonként. A lépésméret ($s = 1,1 \pm 0,2$ megtett nukleotid/hidrolizált ATP, mely $C = 0,87 \pm 0,08$ elfogyasztott ATP/megtett nukleotid sztöchiometriai kapcsoltságnak felel meg), és a kötőhely méret ($b = 12,4 \pm 0,1$ nukleotid) a heparin koncentrációtól függetlenek voltak (**6. táblázat, 10. ábra B panel**). A lassú lineáris fázis során történő ATP fogyasztási sebesség ($0,14 \pm 0,08 \text{ s}^{-1}$) a heparin-kötött BLM^{HM} steady-state ATP-áz aktivitásához ($0,22 \text{ s}^{-1}$; (103)) hasonló értéket adott, jelezvén, hogy ez a fázis a DNS-ről disszociált, csapda-kötött BLM^{HM} ATP-áz aktivitásából származik. Ez az érték megegyezik a dT_{12} esetén mért lassú lineáris fázisból származó ATP-áz aktivitással, ahol a gyors lineáris fázis hiánya azt jelzi, hogy ezen a rövid DNS-en nem történik transzlokáció (**10. ábra A panel betét**).

2. A steady-state ATP fogyasztás ssDNS hosszfüggése megerősíti a transzlokáció kinetikai modelljét

Vizsgáltuk a BLM^{HM} steady-state bazális ($k_{\text{cat}} = 0,081 \pm 0,007 \text{ s}^{-1}$, $K_{\text{ATP}} = 26 \pm 3 \text{ }\mu\text{M}$) és különböző DNS szubsztrátok (nem-repetitív szekvenciájú oligonukleotidok, oligo dT_3 - dT_{90} , M13 fág DNS) által aktivált ATP-áz aktivitását, PK/LDH kapcsolt reakció során. Megfigyeléseink alapján az oligo dT szubsztrátok aktiváló hatása kicsivel erősebb volt, mint az azonos hosszúságú random szekvenciáké, vagy az M13 fág DNS-é. Továbbá a foszforotioát módosított dT_{90} hasonló mértékben stimulálta az ATP-áz aktivitást ($k_{\text{cat, PTO-dT90}} = 20,2 \text{ s}^{-1}$), mint a módosítatlan dT_{90} (**11. ábra B panel**).

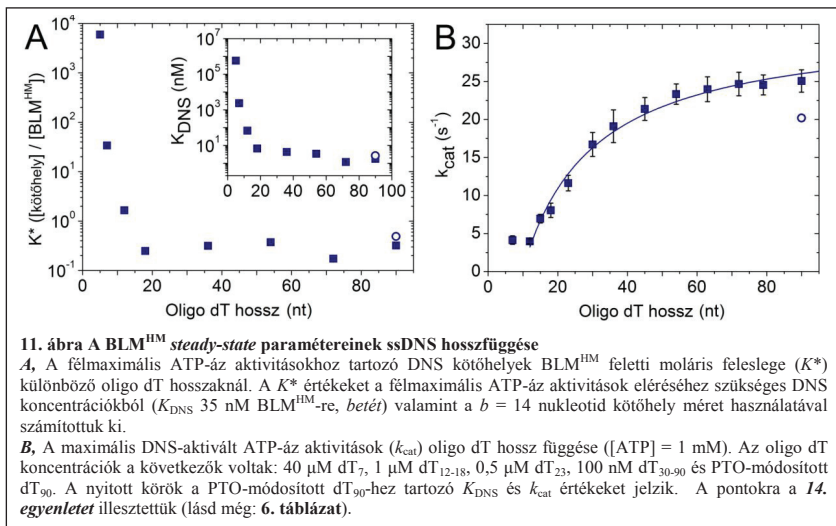
A BLM helikázt növekvő koncentrációjú oligo dT-vel titráltuk, hogy meghatározhassuk a félmaximális ATP-áz aktiváláshoz szükséges DNS koncentrációkat (K_{DNS}). A K_{DNS} értékek meredeken csökkentek amíg az oligo dT hossz el nem érte a kötőhely méretet ($b = 14$ nukleotid) (**11. ábra A panel betét**). Nagyobb hosszaknál a kismértékű csökkenés az oligo dT

kötőhelyek és a BLM^{HM} közti sztöchiometriát tükrözte. Ez a jelenség még szembetűnőbb, ha a K_{DNS} értékek helyett a DNS kötőhelyek moláris feleslegét ábrázoljuk (**11. ábra A panel**).

A maximális ssDNS aktivált ATP-áz átviteli sebességek (k_{cat}) karakterisztikus hosszfüggést mutattak (**11. ábra B panel**). 7-12 nukleotid hosszúságban a k_{cat} értékek stagnáltak ($\sim 5 \text{ s}^{-1}$, megfeleltethető $k_{ATP,end}$ -nek, **9. ábra A panel; 6. táblázat**), majd meredeken emelkedtek, míg elérték a maximális értéket 25 s^{-1} körül (összhangban az **10. ábra A panelén** látható első lineáris fázisból eredő ATP-áz aktivitásokkal), 60 nukleotid hosszánál már kvázi-telítést elérve.

A BLM^{HM} nettó *steady-state* ATP-áz aktivitását (k_{cat}) két különböző ATP hidrolízis ciklus határozza meg, melyek aktivitása különböző. Az ssDNS-hez való kötésekor a BLM^{HM} helikáz átlagosan $(L-b)/2s$ ATP-áz ciklust végez $k_{ATP,trans}$ sebességi állandóval az 5' vég elérése előtt. A végén keresztülmehet több ATP-áz cikluson $k_{ATP,end}$ sebességi állandóval, vagy leválhat $k_{off,end}$ -el. A végén $k_{ATP,end}$ -el végzett ATP-áz ciklusok átlagos száma $k_{ATP,end}/k_{off,end}$ lesz. Telítési ssDNS koncentráció mellett ($>100 \cdot K_{DNS}$) a visszakötés gyorsan történik, így nincs hatással a ciklus sebességére. A viszonylag ritka leválás belső régiókról ($k_{off,int}$) szintén kis hatással van. Így a kötőhely méreténél hosszabb ssDNS-ek esetén a nettó ATP-áz ciklusidő ($1/k_{cat}$) az $1/k_{ATP,trans}$ és $1/k_{ATP,end}$ ciklusidőkkel kerül súlyozásra a következő módon:

$$k_{cat} = \left(\frac{\frac{L-b}{2s} \cdot \frac{1}{k_{ATP,trans}} + \frac{k_{ATP,end}}{k_{off,end}} \cdot \frac{1}{k_{ATP,end}}}{\frac{L-b}{2s} + \frac{k_{ATP,end}}{k_{off,end}}} \right)^{-1} \quad 14. \text{ egyenlet}$$

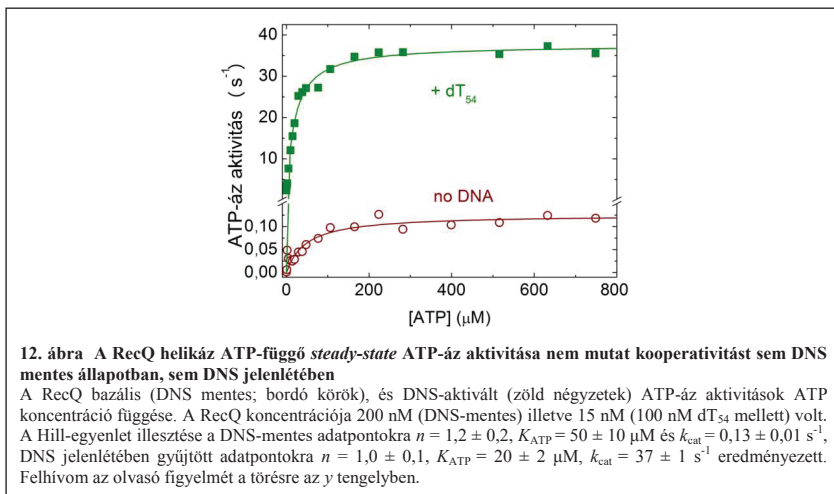


III. A RecQ helikáz mechanobiokémiája

1. A RecQ aktív helyek függetlenül működnek transzlokáció során

Ennek a fejezetnek az alapjául a „RecQ helicase translocates along single-stranded DNA with a moderate processivity and tight mechanochemical coupling.” (Sarló, K, Gyimesi, M, Kovács, M (2012) *Proc Natl Acad Sci U S A* (továbbiakban: (104)) publikációnk szolgált.

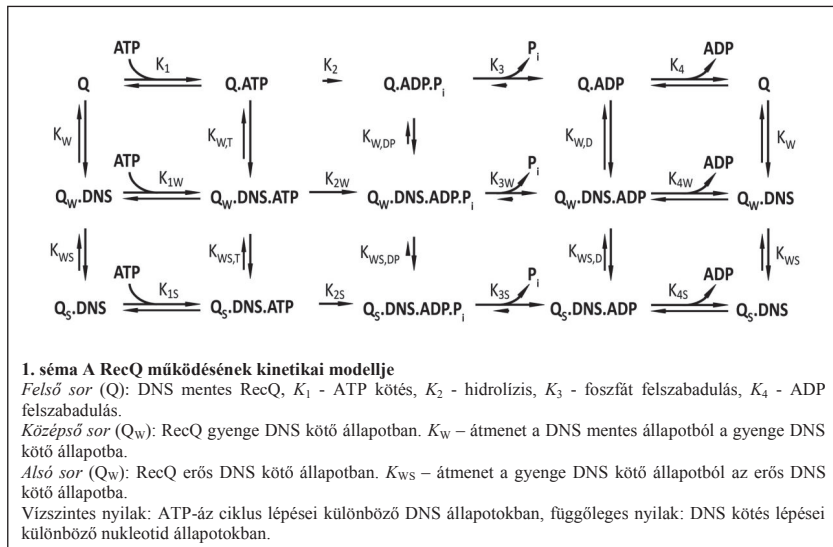
A RecQ ATP-függő *steady-state* ATP-áz aktivitását jellemző kinetikai paramétereket PK/LDH kapcsolt reakcióval határoztam meg, DNS (dT₅₄) jelenlétében és távollétében (12. ábra). A Hill-féle analízis alapján a RecQ nem mutatott kooperativitást (a Hill együttható (*n*) $1,2 \pm 0,2$ volt DNS távollétében, illetve $1,0 \pm 0,1$ volt DNS jelenlétében). Ez azt jelzi, hogy a RecQ aktív helyek egymástól függetlenül működnek jelen körülmények között. Az ATP-re vonatkoztatott *steady-state* Michaelis konstans (K_{ATP}) és katalitikus aktivitás (k_{cat}) az irodalmi adatokkal egybehangzó értéket mutatott (34,105).



2. A RecQ működésének kinetikai modellje

Az alább ismertetendő eredmények alapján felvázoltam a RecQ DNS-kapcsolt ATP-áz ciklusának kinetikai modelljét (1. séma). Ez a modell a kísérleti eredmények alapján feltételezhető legegyszerűbb megközelítés. Tartalmazza az ATP-áz ciklus fő lépéseit (ATP-kötés, ATP hidrolízis, a hidrolízis termékek (foszfát (P_i) és ADP) felszabadulása, DNS-

mentes, és két különböző DNS-kötött állapotban. Munkám során az **1. sémán** szereplő paraméterek többségét meghatároztam. A következő fejezetekben ismertetem a paraméterek meghatározásának menetét, valamint a kísérleti eredmények értelmezését.



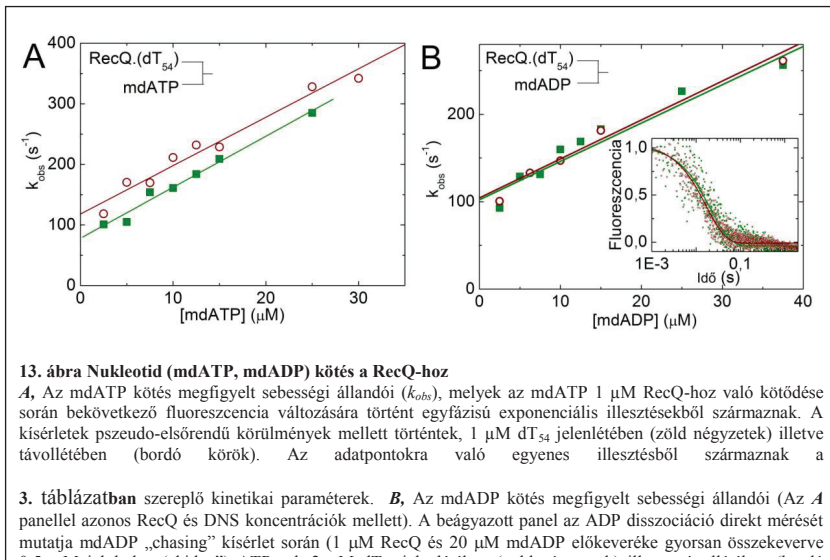
3. Kölcsönhatás a nukleotid szubsztráttal

Ebben a fejezetben publikálatlan eredmények szerepelnek, melyet az „Insights into the DNA activation of the RecQ enzymatic cycle reveal mechanistic diversity within RecQ-family helicases.” (Sarlós, K, Gyimesi, M, Kele, Z, Kovács, M (2012)) előkészületben lévő kéziratunkban foglalunk össze.

i) A gyors és reverzibilis nukleotid kötés a DNS nem befolyásolja

A nukleotid kötés stopped-flow kísérletekkel vizsgáltam, oly módon, hogy a RecQ-t pszeudo-elsőrendű körülmények között (a nukleotid koncentrációja kvázi állandónak tekinthető a reakció során) növekvő koncentrációjú fluoreszcensen jelölt nukleotiddal (3'-(N-metilantranilol)-2'-dezoxi-ATP -és -ADP (mdATP, mdADP)) kevertem össze dT₅₄ jelenlétében és távollétében (**13. ábra**). A fluoreszcencia időbeli változására egyfázisú exponenciális függvényeket illesztettem, melyek meghatározták a megfigyelt sebességi állandókat (k_{obs}). A megfigyelt sebességi állandók nukleotid koncentráció függésére egyeneseket illesztettem, melyek meredeksége meghatározza a kötés, y tengelymetszete pedig

a disszociáció sebességi állandóját. Ezek az értékek hasonlóak voltak DNS jelenlétében és távollétében, illetve kevés különbség volt mdATP és mdADP között (13. ábra, 3. táblázat, 1-es és 4-es lépés az 1. sémában).

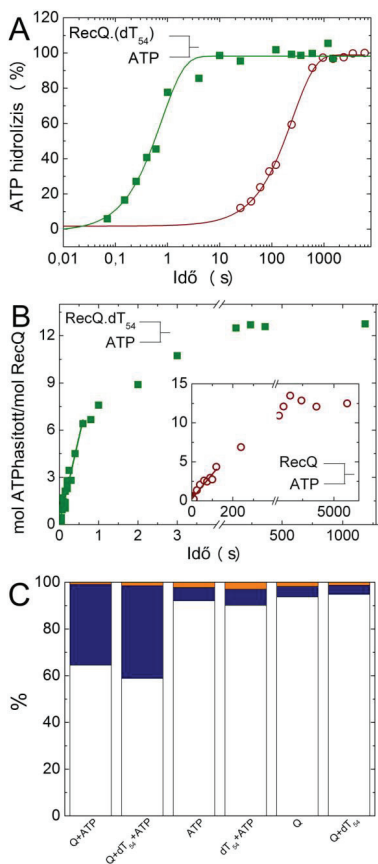


Az mdADP disszociációját a RecQ-ról (1. séma, 4-es lépés) közvetlenül is nyomon követtem ún. „chasing” kísérletekben, ahol a RecQ.mdADP komplexet (dT₅₄-el illetve anélkül) összekevertem nagy feleslegben lévő jelöletlen („hideg”) ATP-vel. A tranziensek egyfázisú exponenciális lefutásúak voltak minden esetben (13. ábra B panelbetét). A megfigyelt sebességi állandók összhangban voltak a kötési kísérletekre illesztett tengelymetszetek értékeivel (13. ábra, 3. táblázat).

Megjegyzendő, hogy az mdATP kötési kísérletek során a fluoreszcencia profil lefutását befolyásolhatja a hidrolízis és az azt követő mdADP-mdATP kicserélődés. Azonban felfedeztem, hogy a RecQ.mdATP és RecQ.mdADP fluoreszcencia szintek nem voltak megkülönböztethetők (sem DNS-ben sem anélkül). Ezen körülmények között a mant fluoreszcencia profilok változatlanok maradnak a nukleotid kötését követő lépések során, a kötési görbék egyfázisú exponenciális lefutásúak lesznek (összhangban megfigyeléseinkkel), valamint tükrözik az mdATP kötés valódi sebességi állandóit.

ii) A sebesség meghatározó kvázi-irreverzibilis hidrolízist a DNS jelentős mértékben gyorsítja

A kémiai lépést DNS jelenlétében és távollétében egyszeri „turnover” quenched-flow kísérletekkel vizsgáltam, radioaktívan jelölt γ - ^{32}P -ATP segítségével (14. ábra A panel). Az ilyen típusú kísérleteknek az az alapja, hogy az enzim koncentrációja magasabb, mint az ATP-é, így az enzim molekulák többsége maximum egy ciklust végezhet. Az ATP hasítás időbeli lefutásában nem volt megfigyelhető „burst” fázis. Annak kizárása érdekében, hogy a „burst” hiányának oka nem a reverzibilis ATP kötés az alkalmazott alacsony ATP koncentráción, többszörös „turnover” kísérleteket is végeztem, melyekben szintén nem volt



14. ábra Az ATP hasítás kinetikájának vizsgálata

Az ATP hidrolízis nyomon követése radioaktívan jelölt γ - ^{32}P -ATP segítségével, egyszeri (A) és többszöri (B) „turnover” quenched-flow kísérletek során. A, Az adatok 4 μM RecQ és 3 μM ATP (bordó körök), illetve 2 μM RecQ, 3 μM dT₅₄ és 1,5 μM ATP (zöld négyzetek) összekeveréséből származnak. A megfigyelt sebességi állandók (k_{obs}) $0,004 \pm 0,0002 \text{ s}^{-1}$ (DNS mentes) és $1,3 \pm 0,15 \text{ s}^{-1}$ (dT₅₄) az adatpontokra történő egyfázisú exponenciális illesztésekből származnak. B, Az adatok 2 μM RecQ, 4 μM dT₅₄ és 25 μM ATP, illetve 4 μM RecQ és 50 μM ATP (ábrabetét) összekeveréséből származnak. A kezdeti meredekségek az ATP hidrolízis sebességeket tükrözik, DNS jelenlétében ($72 \pm 4 \text{ s}^{-1}$) és távollétében ($0,20 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$). C, 1mM ATP 46% ^{18}O izotóp tartalmú vízben történt 1 μM RecQ („Q+ATP”) vagy 1 μM RecQ és 2 μM dT₅₄ („Q+dT₅₄+ATP”) általi hidrolíziséből származó H_2PO_4^- különböző izotóptartalmú populációinak eloszlásai. Fehér oszlopok: nem tartalmaz ^{18}O -t, kék oszlopok: egy ^{18}O épült be, narancssárga oszlopok: két ^{18}O épült be MS analízis alapján. A panelen szintén fel vannak tüntetve kontrollkísérletek eredményei, amelyekből hiányzott a RecQ és a DNS („ATP”), a RecQ („dT₅₄+ATP”), az ATP és a DNS („Q”) illetve az ATP („Q+ATP”).

megfigyelhető „burst” fázis (**14. ábra B panel**). A „burst” fázis hiánya azt jelzi, hogy a hidrolízist követő lépések egyike sem lehet sebesség meghatározó lépés sem DNS jelenlétében sem a távollétében. A DNS a reakciót több mint 300-szorosára gyorsította ($k_{\text{obs,basal}} = 0,0040 \pm 0,0002 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{obs,dT54}} = 1,3 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$). Ezen megfigyelt sebességi állandók megegyeztek a *steady-state* ATP-áz sebességi állandókkal a megfelelő ATP koncentrációkon (**12. ábra B panel**).

A hidrolízis fent leírt viselkedése két különböző kinetikai forgatókönyv alapján képzelhető el. Egyik esetben a k_{obs} (és *steady-state* ATP-áz) értékeket a lassú hidrolízis lépés (k_2) limitálja, melyet egy gyors foszfát felszabadulás követ ($k_{-2} \ll k_3$, **1. séma**). Ebben az esetben a hidrolízis lépés (K_2) sosem ér el belső egyensúlyt a *steady-state* során a foszfát felszabadulás elszívó hatásának köszönhetően. A másik elképzelhető eset egy gyors, de reverzibilis hidrolízis ($k_{-2} \gg k_3$), mely a RecQ.ADP.Pi állapot alulreprezentáltsága miatt egy alacsonyabb nettó sebességet eredményezhet. Annak érdekében, hogy eldönthessem, melyik lehetőség áll fenn a RecQ esetében, meghatároztam a hidrolízis reverzibilitását ^{18}O kicserélődéses kísérletekkel (**14. ábra**) (106). A módszer elvi alapja, hogy hidroliziskor a támadó víz oxigén atomja beépül a leváló γ -foszfátba. Ha a hidrolízis ^{18}O -jelölt vízben történik, az oxigén beépülése nyomon követhető tömeg spektrometriával (MS). Ha a hidrolízis irreverzibilis, a felszabaduló foszfát egy beépült ^{18}O -t fog tartalmazni. Ha reverzibilis, akkor meg fognak jelenni olyan foszfát populációk, melyekbe kettő, vagy több ^{18}O atom épült be.

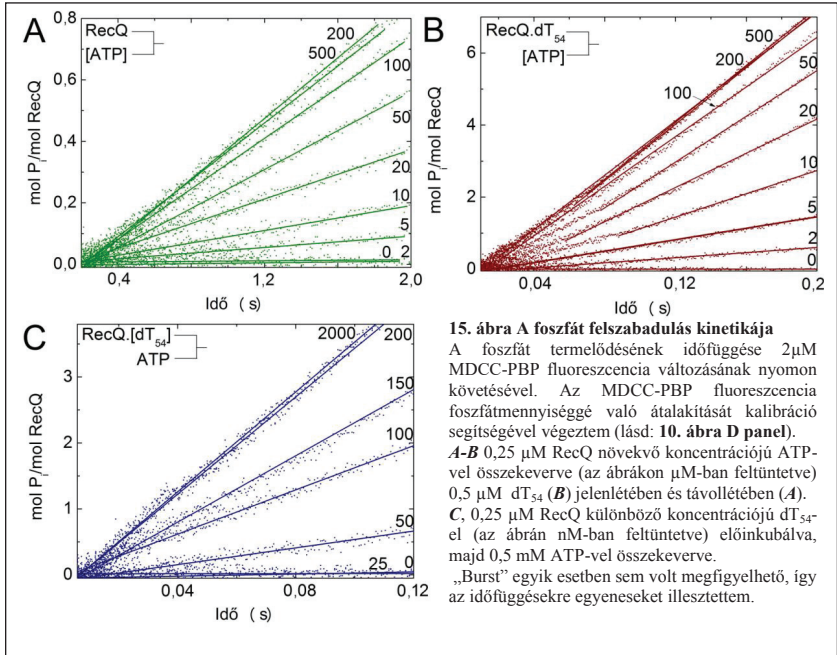
1 mM ATP 1 μM RecQ általi teljes hidrolízise során 46 % ^{18}O tartalmú vízben 35 % egyszeresen és 0,8 % kétszeresen jelölt foszfátpopuláció jelent meg DNS hiányában. A két populáció aránya tükrözi a poszthidrolízis (RecQ.ADP.Pi) állapotból való kimenetek (vagyis a foszfát felszabadulás (k_3), illetve a reverz hidrolízis (k_{-2})) relatív valószínűségét (így a hozzájuk tartozó sebességi állandók arányát). Az adatok alapján $k_3/k_{-2} = 43$, ami jelzi, hogy a hidrolízis lassú és gyakorlatilag irreverzibilis. A helyzet hasonló volt 2 μM dT₅₄ jelenlétében, amikor is 40 % egyszeresen és 1,4 % kétszeresen jelölt foszfátpopulációt detektáltam, mely $k_{3S}/k_{-2S} = 28$ határozott meg. Ezen eredmények alapján a három ^{18}O tartalmú foszfátmolekulák aránya várhatóan kevesebb, mint 0,05 %, ami a detektálási határ alatt van. A RecQ vagy ATP-mentes kontroll kísérletekben a mintákban relatív alacsony mennyiségben jelenlévő foszfát 5-10 %-a volt ^{18}O jelölt, és az egyszeresen illetve kétszeresen jelölt molekulák aránya 2 és 3 között volt (mely a spontán hidrolízisnek illetve az endogén foszfátszennyezésnek köszönhető).

iii) A foszfát felszabadulás gyors és irreverzibilis

A RecQ-ATP interakcióból eredő foszfát felszabadulást (3-as lépés az **1. sémán**) DNS távollétében és jelenlétében fluoreszcensen jelölt foszfátkötő fehérje (MDCC-PBP) segítségével (99) követtem nyomon stopped-flow kísérletekben. A **15. ábra A** és **B** paneljén a foszfát felszabadulás ATP koncentráció függését láthatjuk. A tranzienseket RecQ (**A**) illetve RecQ.dT₅₄ komplex (**B**) különböző ATP koncentrációkkal történő gyors összekeverése után követtem nyomon. Szintén vizsgáltam a reakció dT₅₄ koncentráció függését telítési ATP koncentrációnál **15. ábra C panel**.

Egyik vizsgált körülmény esetén sem volt „burst” megfigyelhető, jelezvén, hogy a sebesség meghatározó lépés megelőzi a foszfát felszabadulást (vagy megegyezik vele). Ez az eredmény összhangban van a quenched-flow kísérletekkel, melyek azt mutatták, hogy a foszfát felszabadulást megelőző hidrolízis határozza meg az enzimmiklus sebességét mind DNS jelenlétében mind távollétében (**14. ábra**). Az MDCC-PBP fluoreszcencia változásának időfüggése *steady-state* bazális (**15. ábra A panel**) illetve DNS-aktivált (**15. ábra B-C panel**) ATP-áz aktivitásokat tükröznek, melyek a PK/LDH kapcsolt reakcióval mért ATP-áz aktivitásokhoz hasonlóak voltak.

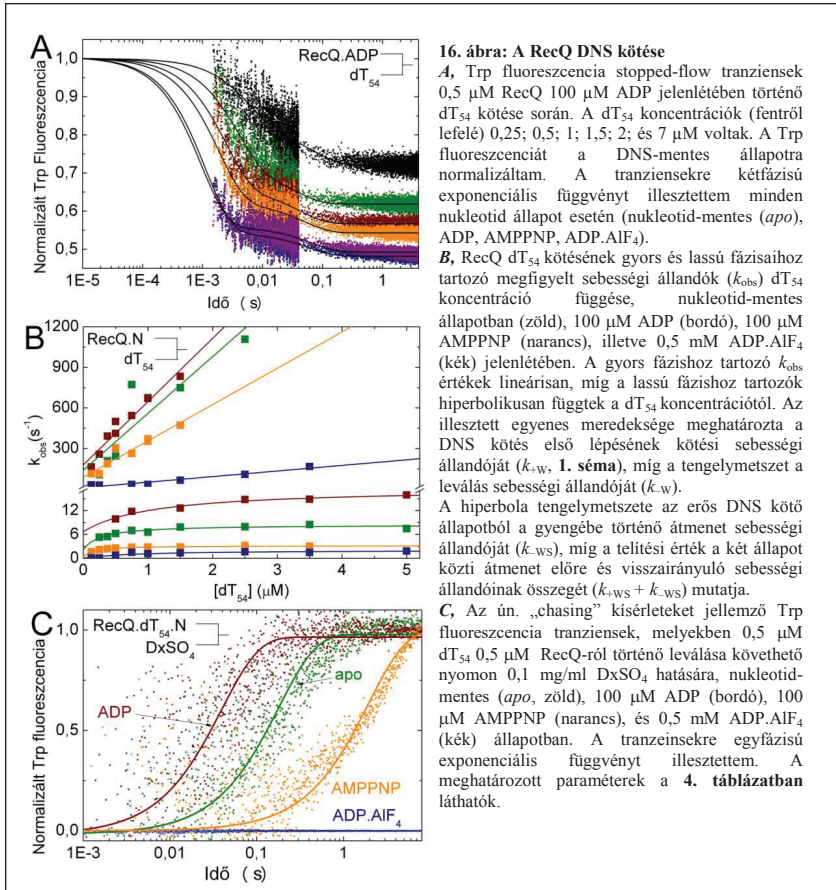
Az MDCC-PBP-vel történő stopped-flow kísérletekben a foszfát felszabadulás irreverzibilis volt, annak következtében, hogy az MDCC-PBP irreverzibilisen köti a foszfátot. Annak érdekében, hogy ennek a lépésnek az eredendő irreverzibilitását meghatározzam, megmértem a *steady-state* ATP-áz aktivitást 20 mM foszfát jelenlétében. Ennek nem volt hatása a k_{basal} és k_{dT54} értékekre. Ez az eredmény azt jelzi, hogy a foszfát, melynek visszakötése esetén az ATP-áz aktivitás csökkenését várnánk, felszabadulás után nem köt vissza az enzimre.



4. Két DNS kötő konformáció és egy zárt állapot észlelése

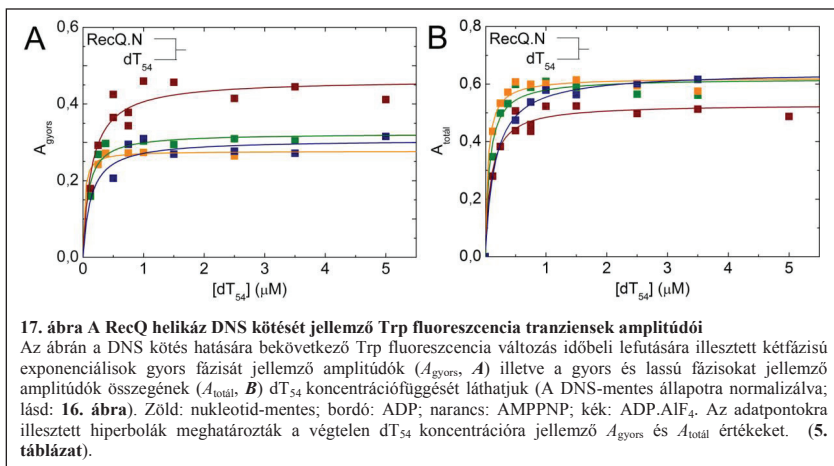
Ebben a fejezetben publikálatlan eredmények szerepelnek, melyeket az „Allosteric effect of nucleotide on the DNA interaction of RecQ helicase.” (Sarlós, K, Gyimesi, M, Kovács, M (2012)) előkészületben lévő kéziratunkban foglalunk össze.

A RecQ ssDNS kötését a triptofán (Trp) fluoreszcencia változásával követtem nyomon stopped-flow kísérletek során. RecQ-t ssDNS-sel pszeudo-elsőrendű körülmények között összekeverve a RecQ Trp fluoreszcencia intenzitása jelentősen lecsökken. Különböző nukleotidok (nukleotid-mentes (*apo*); ADP; AMPPNP; ADP.AIF₄) DNS kötésre gyakorolt



hatását vizsgáltam, mely minden vizsgált esetben kétfázisú exponenciális lefutást mutatott (16. ábra A panel). A gyors fázis megfigyelt sebességi állandói lineárisan függtek a DNS koncentrációtól, míg a lassú fázis megfigyelt sebességi állandói hiperbolikus függést mutattak (16. ábra B panel). E megfigyelés az amplitúdókat jellemző adatokkal együtt (17. ábra, 5. táblázat) egy kétlépéses DNS kötési modellel magyarázható. A modellben a DNS kötés során a RecQ helikáz először egy gyenge DNS-kötő szerkezetet vesz fel (a reakció K_w disszociációs állandóval jellemezhető; 1. Séma), amit egy erős DNS-kötő állapotba történő átmenet követ (K_{ws} egyensúlyi állapottal jellemezhető; 4. táblázat, 1. séma).

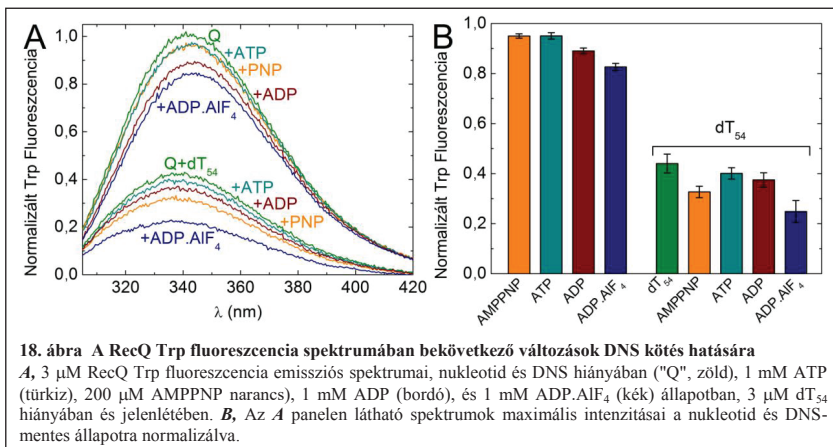
A két fázis k_{obs} értékeinek vizsgálatából és az amplitúdók analiziséből meghatározható a kétlépéses DNS kötést jellemző összes sebességi és egyensúlyi paraméter, valamint a gyenge és erős DNS-kötő állapotok Trp fluoreszcencia szintjei a különböző nukleotid állapotokban (16. ábra és 17. ábra; 4. táblázat 5. táblázat).



A 4. táblázat alapján láthatjuk, hogy a DNS kötés *apo*, ADP és AMPPNP állapotokban hasonló. Ezzel ellentétben az ADP.AIF₄ nagy hatással volt a DNS kötésre. Ez a nukleotid komplex mindkét irányban legalább egy nagyságrenddel lassította a gyenge DNS interakció sebességét (k_{+w} , k_{-w}). Legjelentősebb hatással azonban az erős-gyenge DNS kötő állapotok közti átmenetre volt (k_{ws}), több mint százszorosára csökkentette ennek sebességét. Ez az effektus számottevően növelte a RecQ DNS-affinitását ($1/K_{eq}$).

Az ssDNS felszabadulást a RecQ-ról közvetlenül is vizsgáltam, ún. „chasing” kísérletekkel, melyek során a DNS.RecQ.nukleotid hármas komplexet gyorsan összekevertem nagy mennyiségű, fölös dextranszulfáttal (DNS-szerkezet mimikáló fehérje csapda; DxSO_4), majd a DNS leszorítását a RecQ Trp fluoreszcenciáját megfigyelve követtem nyomon (**16. ábra C panel**). A tranziensekre egyfázisú exponenciális illetve meghatároztam a látszólagos k_{off} értékeket, melyek az erős-gyenge átmenet sebességi állandóinak nagyságrendjébe estek (**4. táblázat**). Megemlítendő, hogy a DNS felszabadulás tranziens profilját a kétlépéses DNS kötési modell több paramétere is befolyásolja. Mindamellett a kísérletben jelenlévő jel-zaj arány mellett meghatározott k_{off} értékek összecsengenek a DNS-kötési kísérletek alapján meghatározott modell értékeivel. Kiemelendő, hogy a DNS disszociáció ADP.AIF₄ által okozott drámai lassulása a „chasing” kísérletekben is megnyilvánult, ahol is a mérés ideje alatt (300 másodperc) nem volt felszabadulás megfigyelhető (**16. ábra C panel**).

A nukleotid és DNS-kötött komplexek további tulajdonságainak megismerésére a RecQ emissziós Trp fluoreszcencia spektrumait vizsgáltam különböző körülmények között (**18. ábra**). Mind dT₅₄ távollétében mind jelenlétében a RecQ.ADP.AIF₄ komplex rendelkezett a legalacsonyabb fluoreszcencia intenzitással, míg a többi nukleotid komplex intenzitása a nukleotid-mentes és az ADP.AIF₄ közé esett. Ez azt jelzi, hogy a RecQ.ADP.AIF₄ komplex a többi állapothoz képest zártabb szerkezettel rendelkezik.



Összefoglalva a kötött nukleotid jelentős hatással volt a RecQ DNS kötő tulajdonságaira. Az alapján, hogy az ATP és az AMPPNP komplexek spektrális viselkedése hasonló volt (**18. ábra**), valamint, hogy ez a két állapot az ADP állapottól szignifikánsan különbözik (**16. ábra** és **18. ábra**), az AMPPNP állapotot a prehidrolitikus állapottal azonosítottuk.

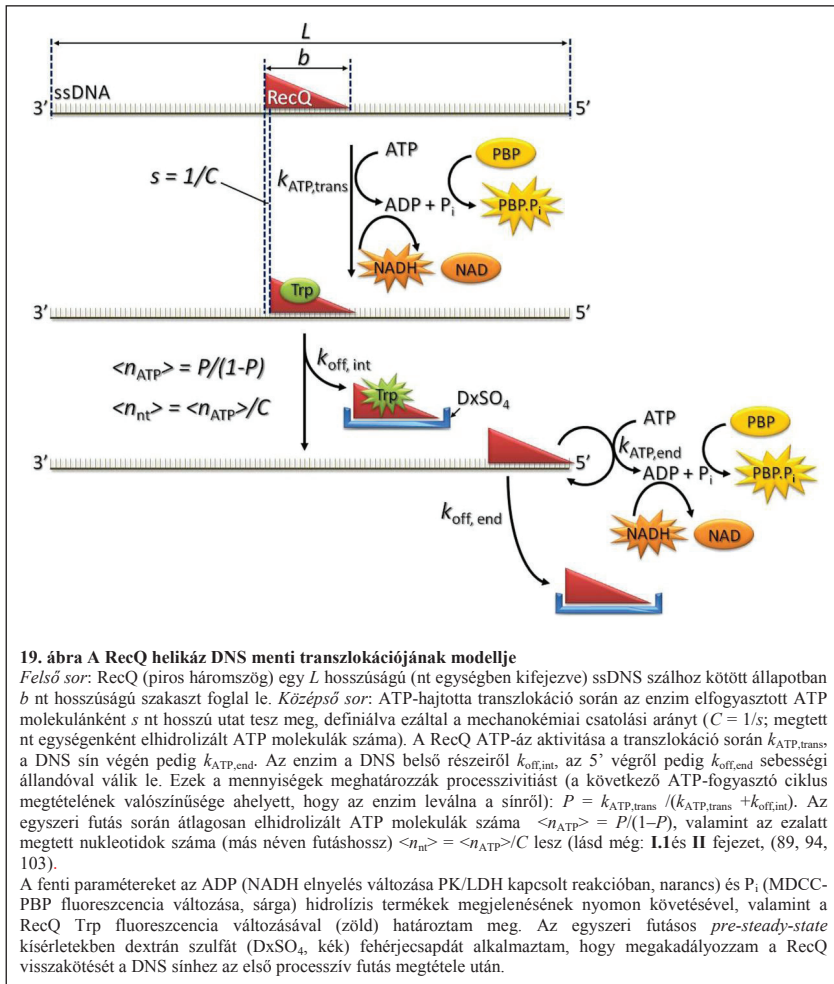
A RecQ.ADP.AIF₄ komplex bármely más állapottól eltérő kinetikus és spektrális tulajdonságokat mutatott (**16. ábra** és **18. ábra**). Emiatt ez az állapot valószínűsíthetően egy ATP-kötött átmeneti állapotnak, vagy egy poszthidrolitikus (ADP.P_i) felel meg, mely a legerősebb DNS kötő („ráfogott”) állapot a mechanokémiai ciklus során.

5. A transzlokációs mechanizmus

Ennek a fejezetnek az alapjául a „RecQ helicase translocates along single-stranded DNA with a moderate processivity and tight mechanochemical coupling.” (Sarlós, K, Gyimesi, M, Kovács, M (2012) *Proc Natl Acad Sci U S A* (továbbiakban: (104)) publikációnk szolgált.

i) Módszerek a RecQ helikáz ssDNS menti transzlokációjának mérésére

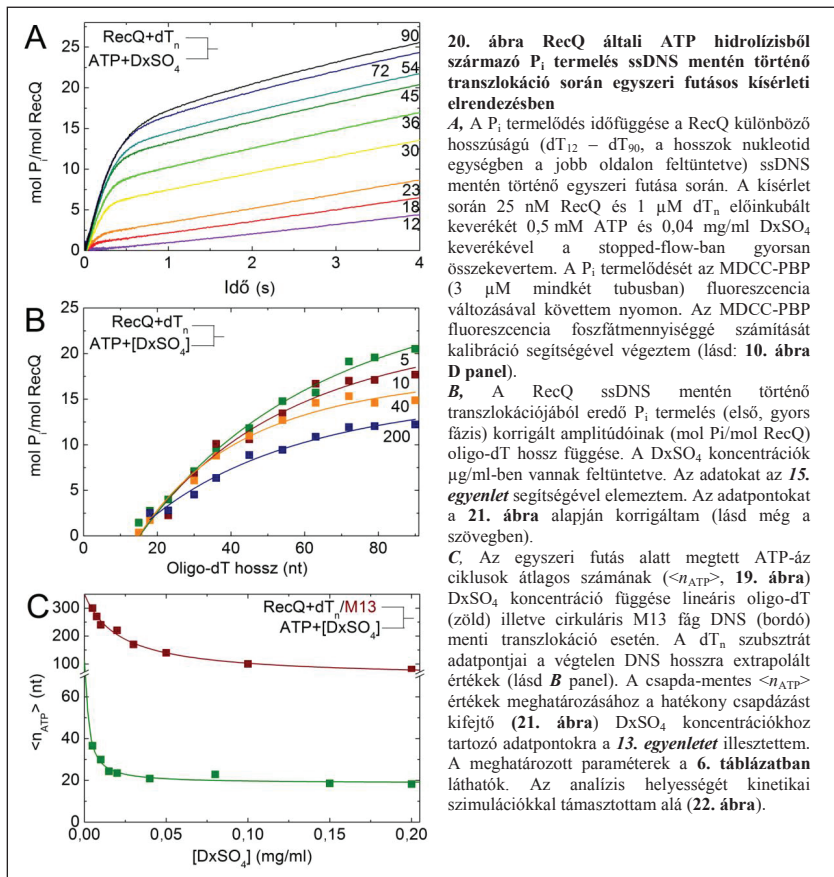
A **19. ábra** összefoglalja az **I.1** és az **II** fejezetekben már részben említett módszereket, melyek eredményeit szintetizálva határoztam meg a RecQ helikáz ssDNS menti transzlokációjának kulcs paramétereit, melyet az ábrán a könnyebb áttekinthetőség kedvéért ismételtelen részletezek. E munka során törekedtem a paraméterek több, független kísérlettel történő meghatározására. Ennek eredményeit az alábbi fejezetekben részletezem. A **6. táblázatban** láthatók összefoglalva a meghatározott kulcs mechanisztikus paraméterek, melyek a **II** fejezetben leírt BLM helikázt jellemző paraméterekkel (103) összehasonlítva szerepelnek.



ii) Az egyszeri futásos kísérletek közepesen magas processzivitást jeleznek

Vizsgáltam a RecQ ssDNS menti transzlokációja során ATP hidrolízisével termelődő P_i tranzien্স felszabadulását, az MDCC-PBP fluoreszcencia változását nyomonkövetve (**20. ábra A panel**) (89,103). Ezen kísérletek során a DNS szerkezetét mimikáló dextrán szulfátot (DxSO₄) használtam fehérje csapdaként, hogy egyszeri futásos körülményeket biztosítsak. A

RecQ-t különböző hosszúságú ssDNS oligonukleotidokkal illetve M13 cirkuláris fág DNS-sel előinkubáltam, majd gyorsan összekevertem nagy mennyiségű ATP és DxSO_4 keverékével a stopped-flow-ban. A reakció két jól elkülöníthető fázisból állt, köztük karakterisztikus törésponttal, ami az enzim egy transzlokációs esemény utáni leválását jelezte. Az első fázis az ssDNS menti transzlokáció alatti ATP hidrolízisből, míg a második fázis a csapdakötött állapotban történő ATP hidrolízisből származott (**20. ábra A panel**).



Itt megjegyezném, hogy mivel a BLM helikázzal ellentétben a RecQ ATP-áz ciklusának sebesség meghatározó lépése megelőzi a foszfát felszabadulást, így a RecQ-val végzett egyszeri futásos kísérletek csak két fázisból álltak, és nem tartalmazták a BLM helikázra jellemző *pre-steady-state* exponenciális burst fázist. Lásd: **10. ábra**)

Az egyszeri futásos kísérletek transzienseit az **I.1** fejezetben leírtak alapján elemeztem. A kapott, enzimkoncentrációval normált amplitúdók (mol P_i/mol RecQ) DNS hosszfüggésére (**20. ábra B panel**) a *9. egyenlet* (lásd 21. oldal, (89)) egy módosított változatát illesztettem:

$$A_{\text{rand}}(L) = \langle n_{\text{ATP}} \rangle \left(1 - \frac{1}{C(L-b)+1} \frac{1 - \left(\frac{\langle n_{\text{ATP}} \rangle}{\langle n_{\text{ATP}} \rangle + 1} \right)^{C(L-b)+1}}{1 - \frac{\langle n_{\text{ATP}} \rangle}{\langle n_{\text{ATP}} \rangle + 1}} \right) \quad 15. \text{ egyenlet}$$

Ahol az *x*-tengelymetszet a *b* kötőhely méretet, a kezdeti meredekég a *C* csatolási arányt, a végtelen sínhosszra extrapolált maximális P_i termelési amplitúdó pedig az $\langle n_{\text{ATP}} \rangle$ (ezáltal a $P = \langle n_{\text{ATP}} \rangle / (\langle n_{\text{ATP}} \rangle + 1)$) paramétert tükrözi. Az illesztések $b = 18 \pm 2$ nt és $C = 1,1 \pm 0,2$ ATP/nt eredményeztek, mely értékek a csapda koncentrációtól függetlenek voltak.

Az egyszeri futásos kísérleteket több különböző csapda koncentráción is elvégeztem (**20. ábra B-C panel**). A maximális transzlokációs P_i termelési amplitúdókat a csapda jelenléte jelentősen befolyásolta (**20. ábra C panel**), habár a csapda hatása kevésbé volt kifejezett M13 DNS esetén az oligo-dT szubsztrátokhoz képest. Ez valószínűsíthetően a „vég-effektusok” hiányának köszönhető M13 DNS esetén. A RecQ csapdamentes processzivitásának meghatározásához az $\langle n_{\text{ATP}} \rangle$ értékek csapda koncentráció függésére *13. egyenlet* (lásd 26. oldal, (89)) egy módosított változatát illeszttem (**20. ábra C panel**):

$$\langle n_{\text{ATP}} \rangle ([T]) = \frac{K'_d + [T]}{\frac{K'_d}{\langle n_{\text{ATP}}^0 \rangle} + \frac{[T]}{\langle n_{\text{ATP}}^T \rangle}} \quad 16. \text{ egyenlet}$$

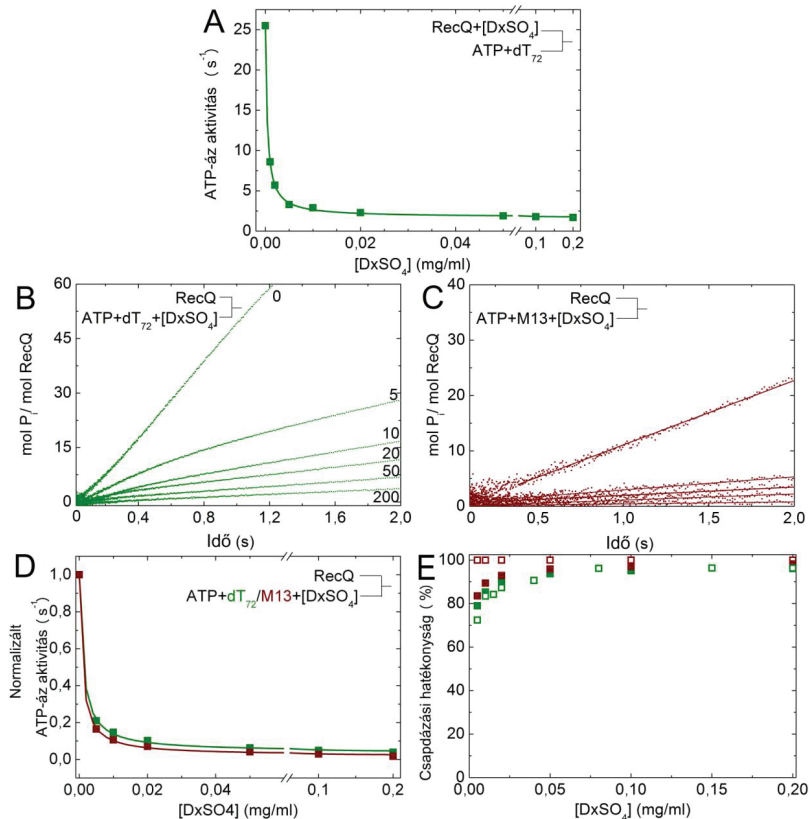
Ahol az $\langle n_{\text{ATP}}^0 \rangle$ és az $\langle n_{\text{ATP}}^T \rangle$ értékek a nulla és a telítési csapdakoncentrációra extrapolált $\langle n_{\text{ATP}} \rangle$ értékek, K'_d definíciója pedig a *13. egyenlet* leírásánál található (lásd 26. oldal). Az extrapolált csapdamentes $\langle n_{\text{ATP}} \rangle$ értékek dT_n esetében 110-nek, M13 esetében 350-nek adódtak, melyek 0,991 és 0,997 közötti processzivitás értékeket eredményeztek (**19. ábra és**

20. ábra, C panel; 1. táblázat). Ezek alapján az átlagos processzív futási hossz ($\langle n_{nt} \rangle = \langle n_{ATP} \rangle / C$) 100-320 nt.

A nulla csapdakonzentrációra extrapolált ATP-fogyasztási adatok megbízhatóságának feltétele, hogy a csapdázási hatékonyság közel 100% legyen az alkalmazott csapdakonzentrációk alacsony értékei esetén is. A csapdázási hatékonyság értelmezhető *steady-state* hatékonysággként (ez alatt a *steady-state* DNS-aktivált ATP-áz aktivitás gátlásának mértéke értendő), és *pre-steady-state* (ez alatt a gyors fázishoz tartozó P_i termelési amplitúdó csökkentésének mértéke értendő) hatékonysággként. A *steady-state* csapdázási hatékonyságot a DNS-aktivált ATP-áz aktivitások $DxSO_4$ koncentráció függésén (**21. ábra A és D panel**) keresztül határoztam meg. Az adatok alapján a *steady-state* csapdázási hatékonyság több mint 90% 0,005 mg/ml csapda koncentráció felett, így az ebben a tartományban gyűjtött adatpontokat kevésbé terhelte hibával ez az effektus.

A *pre-steady-state* csapdázási hatékonyság meghatározásához a gyors P_i felszabadulási amplitúdók $DxSO_4$ koncentrációfüggését vizsgáltam úgy, hogy RecQ-t összekevertem ATP, $DxSO_4$, és dT_{72} illetve M13 DNS keverékével (**21. ábra B-C panel**). Fontos kiemelni, hogy ezekben a kontrollkísérletekben a RecQ sem a DNS-sel sem a $DxSO_4$ csapdával nem volt előzetesen összekeverve. Ennek az volt a célja, hogy a két ligandum közti kinetikai versengés mértékét meghatározhassam. A *pre-steady-state* csapdázási hatékonyságot (E_{PSS}) a kontrollkísérletekben megfigyelt ($A_{kontroll}$, **21. ábra B-C panel**), és az azonos körülmények között (ám különböző összekeverési sorrend esetén) megfigyelt ($A_{korrigálatlan}$, **20. ábra A panel**) P_i felszabadulási amplitúdókból számítottam ki az alábbi módon: $E_{PSS} = (A_{korrigálatlan} - A_{kontroll}) / A_{korrigálatlan}$. dT_{72} esetén az E_{PSS} 0,005 mg/ml és 0,04 mg/ml $DxSO_4$ koncentrációk között 72 %-ról 90 % fölé emelkedett (**21. ábra E panel**). (Oligo-dT szubsztrátok esetén, a **20. ábra B paneljén** szerepelnek az egyes $DxSO_4$ koncentrációknál kiszámolt $A_{korrigált}$ ($= A_{korrigálatlan} - A_{kontroll}$) értékek, melyek alapul szolgáltak a **20. ábra C paneljén** látható $\langle n_{ATP} \rangle$ értékek meghatározásához.) M13 DNS esetén még a legalacsonyabb $DxSO_4$ koncentráció esetén (0,005 mg/ml) sem volt megfigyelhető gyors P_i felszabadulás, így az E_{PSS} 100 % volt minden megfigyelt körülmény esetén (**21. ábra C és E panel**).

Annak érdekében, hogy az egyszeri transzlokációs kísérletek **I.1** fejezetben leírt analizisének helyességét abban a realisztikus esetben is ellenőrizsem, melyben a csapda aktívan leszedi az enzimet a sínről, kinetikai szimulációkat végeztem. A **22. ábra A paneljén** látható kinetikai séma egy végtelen DNS sín mentén csapda jelenlétében processzíven transzlokáló enzim ATP hidrolíziséből keletkező P_i termelését modellezi.



21. ábra A RecQ hidrolízis profilok DxSO₄ koncentrációfüggése ssDNS jelenlétében

A, Az ATP-áz aktivitásokat 50 nM RecQ és változó koncentrációjú DxSO₄ keverékét 0,5 μ M dT₇₂ és 0,5 mM ATP keverékével stopped-flow-ban összekeverve vizsgáltam. MDCC-PBP (3 μ M mindkét tubusban) fluoreszcencia változásával követtem nyomon a P_i felszabadulás lineáris menetét. A RecQ ATP-áz aktivitását (26s⁻¹ DxSO₄ hiányában) szignifikánsan, de nem teljes mértékben gátolta a csapda 1,7 s⁻¹ végső értékig, a félmaximális gátlás 0,0004 mg/ml DxSO₄ koncentrációnál jelentkezett. M13 DNS esetén az ATP-áz profilok hasonlóak voltak. Ezen eredmények tükrében belátható, hogy a *steady-state* csapdázási hatékonyság (vagyis a DxSO₄-kötött RecQ molekulák aránya) több mint 90% 0,005 mg/ml feletti DxSO₄ koncentrációknál, így az egyszeri futások kísérletek analizálásánál e régió adatpontjait használtam (**20. ábra, C panel**).

21. ábra A RecQ hidrolízis profilok DxSO₄ koncentrációfüggése ssDNS jelenlétében (folytatás)

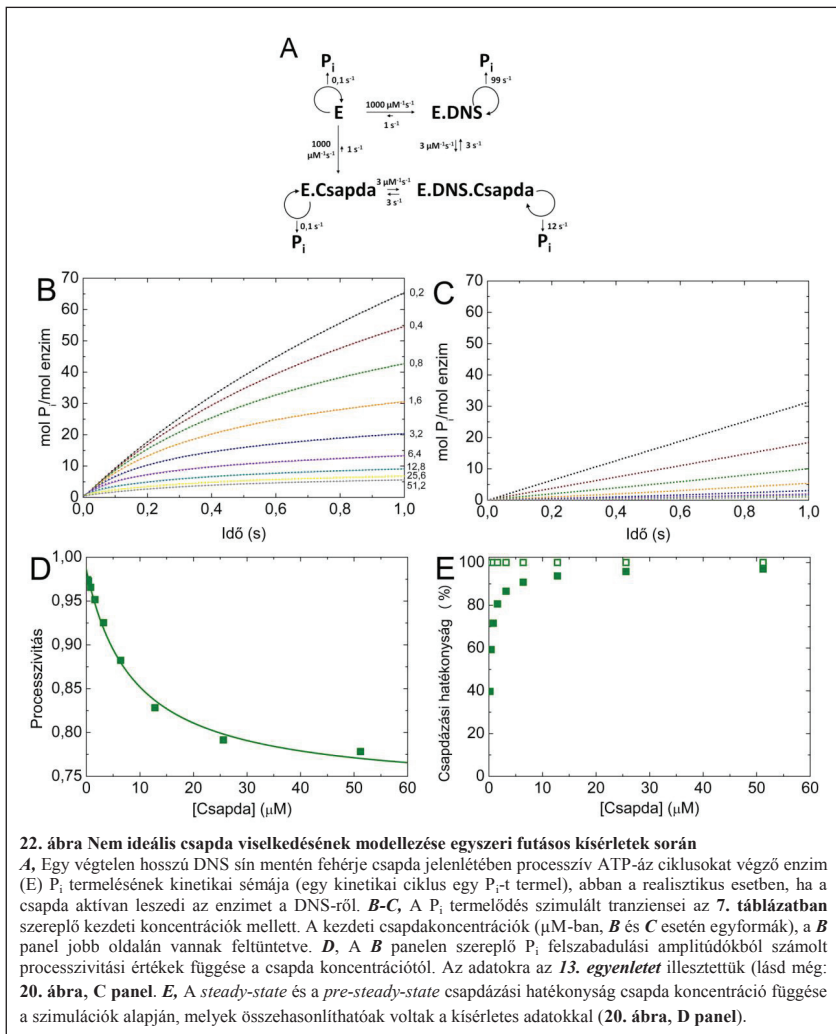
B-C, Annak érdekében, hogy a DxSO₄ *pre-steady-state* csapdázási hatékonyságát (vagyis az ssDNS transzlokációhoz tartozó amplitúdó csökkentése az egyszeri futások kísérletek során) meghatározzam, a P_i termelés gyors transziens profiljait vizsgáltam. Ez oly módon történt, hogy összekevertem 50 nM RecQ-t és 0,5 mM ATP, 1 μM dT₇₂ valamint növekvő koncentrációjú DxSO₄ keverékével (**B**, DxSO₄ a koncentrációk μg/ml-ben feltüntetve) illetve 10 nM RecQ-t 0,5 mM ATP, 5 nM M13 fág DNS valamint növekvő koncentrációjú DxSO₄ keverékével (**C**, a DxSO₄ koncentrációk lentől fölfelé 0, 5, 10, 20 és 100 μg/ml voltak). A P_i felszabadulást az MDCC-PBP fluoreszcencia növekedésével követtem nyomon (5 μM mindkét tubusban). dT₇₂-vel folytatott kísérletek során 50 μg/ml DxSO₄ alatt megfigyelhető volt egy mérhető amplitúdójú gyors fázis, jelezvén, hogy ezeken a DxSO₄ koncentrációkon a *pre-steady-state* csapdázási hatékonyság nem volt teljes. Ezeket az amplitúdókat felhasználtam a **20. ábra** $\langle n_{ATP} \rangle$ adatpontjainak korrekciójához (a részleteket lásd a szövegben). M13 DNS esetén nem volt megfigyelhető gyors fázis, jelezvén, hogy a *pre-steady-state* csapdázás teljes volt alacsony DxSO₄ koncentráción is.

D, A C panel kísérletei során mért lassú fázisok meredekségéből számolt normalizált ATP-áz aktivitások DxSO₄ koncentráció függését mutatja, ismét a *steady-state* csapdázási hatékonyságot tükrözvén. (A gátolatlan ATP-áz aktivitás 50 s⁻¹ volt dT₇₂ és 17s⁻¹ M13 esetén.) Az adatokra történő hiperbolikus illesztésekből számolt félmaximális gátlás 0.001 mg/ml DxSO₄ mind dT₇₂ (zöld), mind M13 (bordó) esetén.

E, A *pre-steady-state* (üres) és *steady-state* (teli) csapdázási hatékonyságok DxSO₄ koncentráció függése dT₇₂ (zöld) és M13 (bordó) DNS esetén.

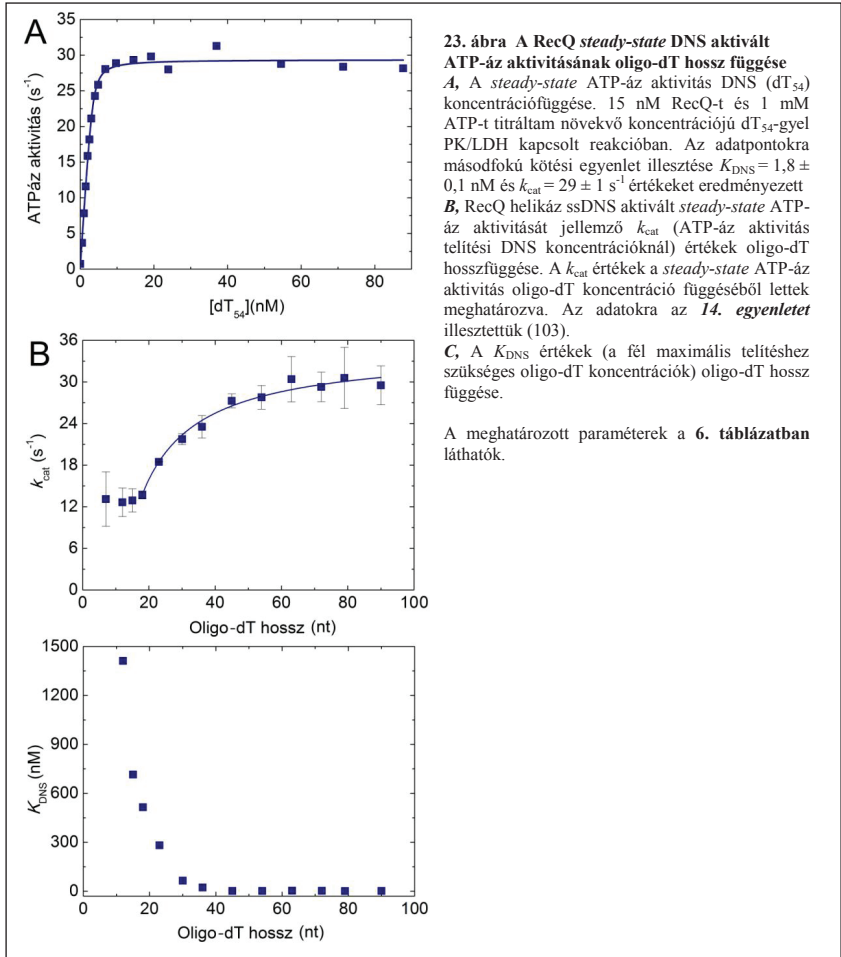
A modell a következő, az egyszeri futások kísérletekre (**20. ábra**) vonatkozó realiztikus megfontolásokat tartalmazza: (i) a csapda a szabad enzimhez és az enzim.DNS komplexhez is tud kötni; (ii) minden interakció az enzim a sín és a csapda között reverzibilis; (iii) a csapda az enzimet aktívan leválasztja a sínről, és csökkenti annak processzivitását; (iv) mindegyik enzim *species* rendelkezik ATP-áz aktivitással, közülük a legaktívabb az enzim.DNS komplex. A **22. ábra B-C panelje** mutatja a kinetikai séma alapján szimulált transzienseket (a kezdeti koncentrációk az **7. táblázatban** vannak feltüntetve μM-ban). Az analitikus kísérletekben (**22. ábra B panel**, lásd még **20. ábra, A panel**) kezdetben az összes enzim molekula DNS-hez volt kötve. A kontroll kísérletekben (**22. ábra C panel**, lásd még **20. ábra B panel**) kezdetben minden enzim molekula DNS- és csapdamentes volt. Hogy meghatározzam a csapdamentes processzivitást, a **22. ábra B panel** amplitúdóiból származtatott processzivitás értékekre a **13. egyenletet** illesztettem (**22. ábra D panel**). Az illesztett és az eredendő csapdamentes (P_0) és csapdával telített (P_T) processzivitás értékek összehasonlítását a **8. táblázatban** láthatjuk. A táblázat alapján láthatjuk, hogy a megfigyelt processzivitások csapda koncentrációfüggésének analízise (**22. ábra D panel**) megbízhatóan reprodukálja az eredeti csapdamentes processzivitás értéket (P_0), még abban az esetben is, ha az enzim a DNS és a csapda közti interakciók reverzibilisek, mely nem teljes csapdázási hatékonyságot eredményez. (A **22. ábra E paneljén** láthatjuk a szimulációk alapján számított *steady-state* és *pre-steady-state* csapdázási hatékonyságot, melyek a kísérletes eredményekkel

(21. ábra E panel) összemérhetőek voltak.) Érdekes módon az analízis a csapdamentes processzivitást pontosabban határozta meg, mint a csapdával telített processzivitást.



iii) A steady-state kinetika DNS hosszfüggése

Ahogy korábban, az **I.1.** fejezetben (103) már láthattuk, helikázok *steady-state* ATP-áz aktivitását jellemző paraméterek (ATP-áz aktivitás telítési DNS koncentráció (k_{cat}), valamint a félmaximális telítéshez szükséges DNS koncentráció (K_{DNS} , egy példa dT_{54} esetén a **23. ábra A paneljén** látható) ssDNS hosszfüggése a transzlokációs mechanizmusról számos információt hordoz (**19. ábra**).



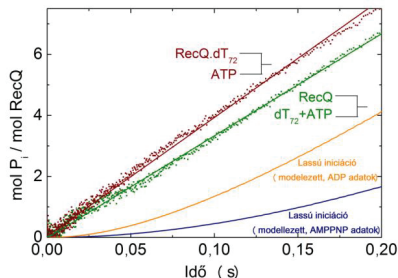
Ennek érdekében megvizsgáltam a RecQ helikáz *steady-state* ATP-áz aktivitásának ssDNS hosszfüggését PK/LDH kapcsolt reakcióval (**23. ábra**). A korábban vizsgált humán BLM helikázhoz hasonlóan (**II. fejezet**, (103)) a k_{cat} és K_{DNS} értékek nagymértékben függtek az ssDNS hosszától (**23. ábra**). A k_{cat} értékek 18 nukleotidig stagnáltak, majd növekedtek az oligo-dT hossz függvényében, és kvázi-telítést mutattak 60 nukleotid fölött (**23. ábra A panel**). A k_{cat} értékek ssDNS hosszfüggésének analiziséhez az **I.1.** fejezetben bemutatott módszert alkalmaztam (**14. egyenlet**, (103)). Az analízis alapján meghatároztam a transzlokáció közbeni ATP-áz aktivitást ($k_{\text{ATP,trans}} = 35 \pm 4 \text{ s}^{-1}$), a végeken végzett ATP-áz aktivitást ($k_{\text{ATP,end}} = 14 \pm 2 \text{ s}^{-1}$, valamint a végről való leválás sebességi állandóját ($k_{\text{off,end}} = 4 \pm 1 \text{ s}^{-1}$, **6. táblázat**). Ezek mellett a lépésméret $s = 0,91 \pm 0,13 \text{ nt/ATP}$ valamint az enzim által lefedett DNS hossz is meghatározható volt ($b = 18 \pm 2 \text{ nt}$; **6. táblázat**).

A K_{DNS} értékek 23 nukleotid DNS-hosszig erősen csökkentek (**23. ábra C panel**), ami a k_{cat} értékek analiziséből, valamint a P_i termelési amplitúdókból (**20. ábra B panel**) konzisztensen meghatározott $b = 18 \pm 2 \text{ nt}$ értékhez képest kicsivel nagyobb kötőhely méretet jelez (**6. táblázat**). Viszont a K_{DNS} értékek ssDNS hosszfüggése csak kvalitatív elemzést tesz lehetővé, így a b értékére egy felső határt szab meg.

23. ábra által bemutatott adatok analiziséhez felhasznált modell az ssDNS hosszfüggést két különböző ATP-áz ciklus jelenlétével értelmezi (**I.1. fejezet**, (89,103)). Egy, a transzlokáló enzimhez köthető ($k_{\text{ATP,trans}}$, **6. táblázat**) ciklus és egy, az ssDNS végen leválás előtt végzett „felesleges” ciklus ($k_{\text{ATP,end}}$) jelenlétével. Más, alternatív modellek ezt a jelenséget úgy értelmezték, hogy a transzlokáció megkezdése előtt egy lassú iniciációs lépés befolyásolja a k_{cat} -ot (92). Ilyen jellegű lassú iniciációt reprezentálhat a RecQ DNS kötésének második, lassú lépése (**III.4. fejezet**, **16. ábra**, **4. táblázat**). Ezt a lehetséges magyarázatot megvizsgálándó kontrollkísérleteket végeztünk, melynek során az ATP hidrolízis folyamatát követtük nyomon (MDCC-PBP fluoreszcencia segítségével) két keverési variáció esetén. Az egyik esetben DNS-mentes RecQ-t kevertünk össze dT₇₂ és ATP keverékével, a másik esetben a RecQ.dT₇₂ komplexet kevertük össze ATP-vel (**24. ábra**). A két görbe hasonló lefutást mutatott, valamint egyik esetben sem volt megfigyelhető egy szignifikáns „lag” fázis, mely lassú iniciáció esetén (a DNS-kötési adatok alapján modellezve) megfigyelhető kellene legyen a kísérlet során. Ez a megfigyelés kizárja annak lehetőségét, hogy a lassú iniciáció szignifikáns hatást gyakorol a k_{cat} értékekre.

Az MDCC-PBP-vel mért *steady-state* ATP-áz aktivitások (20. ábra A panel) analiziséből nyert paraméterek jó egyezést mutattak a PK/LDH kapcsolt reakció során mért *steady-state* ATP-áz aktivitások analiziséből nyert értékekkel (6. táblázat).

A PK/LDH kísérletekből eredő (23. ábra) transzlokáció alatti ATP-áz aktivitás ($k_{\text{ATP,trans}} = 35 \pm 4 \text{ s}^{-1}$) valamint az egyszeri futásos kísérletekből eredő (20. ábra) csatolási arány ($C = 1,1 \pm 0,2 \text{ ATP/nt}$) értékek ($k_{\text{trans}} = k_{\text{ATP,trans}}/C = 31 \pm 8 \text{ nt/s}$) makroszkopikus transzlokációs sebességet definiálnak.



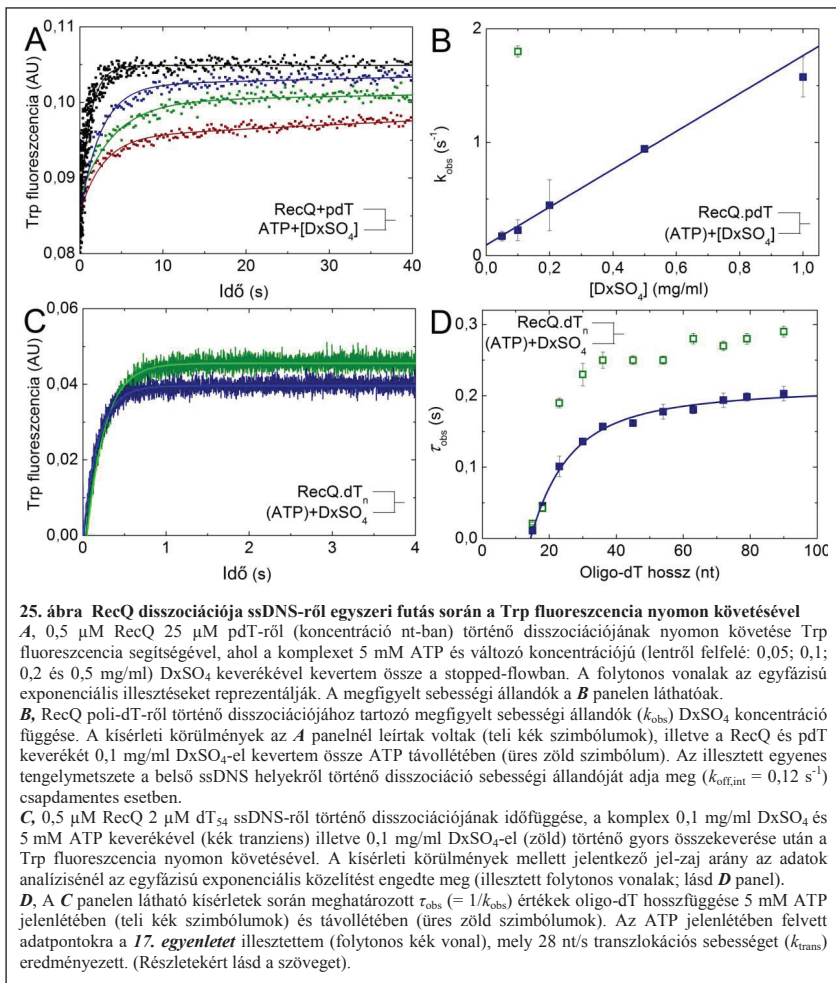
24. ábra P_i termelés a RecQ dT_{72} menti transzlokációjának iniciációja során különböző keverési körülmények között

A P_i termelés kinetikája MDCC-PBP fluoreszcenciájának nyomon követésével, melynek során 100 nM RecQ és 1 μM dT_{72} keverékét 0,5 mM ATP-vel (bordó pontok) kevertük össze, illetve DNS-mentes RecQ-t dT_{72} és ATP keverékével (előzővel azonos koncentrációk; zöld pontok) kevertük össze. Az adatsorokra történt lineáris illesztésekből 39 s^{-1} és 33 s^{-1} *steady-state* ATP-áz aktivitások származtak. A P_i termelés modellezett tranziensei narancssárga és kék vonalakkal vannak feltüntetve, melyek várhatóak lennének abban az esetben, ha egy gyenge-erős DNS-kötő átmenet vezérelte lassú iniciáció történne a DNS-mentes RecQ ATP és DNS keverékével való összekeverésekor (4. táblázat; az AMP.PNP és ADP kötött RecQ adatok képezték a szimulációk alapját).

iv) A transzlokációs modell alátámasztása a RecQ ssDNS menti transzlokációja során történő disszociáció vizsgálatával

Az egyszeri futásos (**20. ábra**) és a *steady-state* kísérletek (**23. ábra**) a RecQ ATP-áz aktivitásából származó jelet hasznosítják. Ezek a mérések az aktív enzim koncentrációjának pontos meghatározásán alapulnak. Annak érdekében, hogy a transzlokációs modellt az aktív enzimkoncentrációtól független mérésekkel is megerősítem, megvizsgáltam a RecQ ssDNS menti transzlokációja során bekövetkező disszociációt a RecQ belső Trp fluoreszcencia változásának segítségével (**25. ábra**). Ahogy ezt Fischer és Lohman is tárgyalja (94), egy végtelen sín mentén transzlokáló enzim leválási kinetikáját a belső régiókról való leválást jellemző sebességi állandó ($k_{\text{off,int}}$) fogja meghatározni, így a leválás időfüggése egyfázisú exponenciális függvénnyel lesz jellemezhető. Ennek szellemében meghatároztam a RecQ transzlokáció alatti ssDNS-ről történő leválásának sebességi állandóit (k_{obs}) a kvázi végtelennek feltételezhető poli-dT (pdT) ssDNS belső régióiról, a DxSO_4 koncentráció függvényében (**25. ábra A-B panel**). Egy korábbi, UvrD helikázról szóló munkában leírtakhoz hasonlóan a csapdamentes $k_{\text{off,int}}$ értéket a k_{obs} értékek DxSO_4 koncentrációfüggésére illesztett egyenes y tengelymetszetéből (vagyis ahol a csapdakonzentráció zérus) határoztam meg (**25. ábra B panel**). Az extrapolált csapdamentes disszociációs sebességi állandó ($k_{\text{off,int}} = 0,12 \text{ s}^{-1}$) és a PK/LDH kísérletekben (**23. ábra**) meghatározott k_{trans} értékek definiálják a csapdamentes processzivitás értéket a $P = k_{\text{ATP,trans}} / (k_{\text{ATP,trans}} + k_{\text{off,int}} = 0,997)$ összefüggés alapján. Ez az érték konzisztens az egyszeri futásos kísérletek (**20. ábra**) alapján meghatározott processzivitás értékekkel ($P = 0,991\text{-}0,997$; **6. táblázat**).

Kontrollkísérletekben, melyeket 0.1 mg/ml DxSO_4 mellett, viszont ATP hiányában végeztem, a k_{obs} értékek egy nagyságrenddel nagyobbak voltak, mint azok, melyeknél a mérés során ATP is jelen volt ($1,8 \text{ s}^{-1}$ vs. $0,2 \text{ s}^{-1}$; **25. ábra B panel**). Ez azt jelzi, hogy az ATP jelenlétében végzett Trp fluoreszcencia kísérletek megbízhatóan jelentik az egyszeri futás utáni DNS-ről való leválást.



Annak érdekében, hogy a makroszkopikus transzlokációs sebességet (k_{trans} , nt/s-ban kifejezve), melyet az MDCC-PBP (**20. ábra**) és PK/LDH (**23. ábra**) kísérletek eredményei alapján számítottam ki, egy független kísérlettel is meghatározzam, vizsgáltam az egyszeri futás során történő disszociációt oligo-dT szubsztrátokról 0,1 mg/ml DxSO_4 jelenlétében (**25. ábra C-D panel**). Ilyen típusú adatokat korábban már használtak többféle enzim transzlokációs mechanizmusának vizsgálatához, egyrészt globális kinetikai analízis (9,93,107) másrészt exponenciális közelítés (107-109) segítségével. A RecQ és különböző hosszúságú oligo-dT szubsztrátok keverékének ATP és DxSO_4 keverékével stopped-flow-ban történő gyors összekeverése során felvett Trp fluoreszcencia tranziensekre jól illettek az egyfázisú exponenciális illesztések (**25. ábra C panel**). Az NS3 helikázzal (108) kapcsolatos korábbi megfigyelésekhez hasonlóan az illesztett exponenciális élettídek ($\tau_{\text{obs}} = 1/k_{\text{obs}}$) az oligo-dT hosszokkal együtt nőttek (**25. ábra D panel**, teli kék szimbólumok). A tendencia, hogy az egyszeri futás utáni leválás a sín hosszának növelésével látszólagosan lelassul, nem meglepő egy transzlokáló enzim esetében. Ennek alapján az NS3 helikáz esetében a τ_{obs} értékek ssDNS hosszfüggésének lineáris régiójára történő egyenes illesztéssel határozták meg a k_{trans} paramétert (108). (Végről induló enzimek esetén az illesztett egyenes meredekségének reciproka, random helyről induló enzimek esetén ennek fele fogja a k_{trans} értéket meghatározni.) RecQ esetén a τ_{obs} értékek oligo-dT hosszfüggése már rövidebb oligo-dT hosszoknál is telítési profilt mutatott (**25. ábra D panel**). Emiatt nehézkessé vált a kezdeti meredekség lineáris közelítéssel történő meghatározhatósága. Ezért egy olyan egyenletet illesztettünk, amely fix hosszúságú DNS-ek mentén transzlokáló enzim esetén, random indulási pozíciót feltételezve figyelembe veszi a lépések átlagos számát:

$$\tau_{\text{obs}}(L) = \tau_{\text{unit}} \frac{P}{1-P} \left(1 - \frac{1}{(L-b)/m+1} \frac{1-P^{(L-b)/m+1}}{1-P} \right) \quad 17. \text{ egyenlet}$$

Ez az egyenlet egy módosított verziója a **7. egyenletnek** (89), ahol P az adott csapda koncentrációra jellemző processzivitás (a következő transzlokációs lépés megtételének a valószínűsége), b a kötőhely méret (nt-ban), τ_{unit} egy lépés átlagos élettideje (másodpercben), m a lépésenként megtett távolság (nt-ban), valamint L a sín hossza (nt-ban). A makroszkopikus transzlokációs sebességet (mértékegység: nt/s) a $k_{\text{trans}} = m/\tau_{\text{unit}}$ összefüggés definiálja.

A **25. ábra D paneljén** szereplő ATP jelenlétében felvett adatpontokra a fenti egyenletet illesztettem (teli kék szimbólumok, folytonos vonal). Annak ellenére, hogy m , τ_{unit} és P

kovariánsak voltak (ahogy ez a **I.1.i**) fejezetben, valamint (89)-ben részletezett elméleti megfontolások alapján várható is, jelezvén, hogy ez a típusú analízis a mikroszkopikus paraméterekről kevés információt hordoz), a k_{trans} ($= m/\tau_{\text{unit}}$, mely a kezdeti meredekség reciprokának felével megegyezik) robusztus módon meghatározható volt. Az illesztésből származó paraméterek a következők voltak: $P = 0,91$; $b = 14$ nt; $m = 0,58$ nt; és $\tau_{\text{unit}} = 0,021$ s; melyek $k_{\text{trans}} = 28$ nt/s transzlokációs sebességet határoznak meg. A meghatározott k_{trans} az MDCC-PBP és PK/LDH kísérletek eredményei alapján számolttal konzisztens volt ($k_{\text{trans}} = 31$ nt/s; **20. ábra** és **23. ábra, 6. táblázat**). A meghatározott k_{trans} robusztusságát az is jelzi, hogy abban az esetben, ha mesterségesen rögzítettem az $m = 1$ nt paramétert, k_{trans} értéke csak kis mértékben tért el ($k_{\text{trans}} = 27$ nt/s). Ez az illesztés $\tau_{\text{unit}} = 0,037$ paramétert, valamint egy, a **25. ábra D paneljén** mutatott illesztéstől megkülönböztethetetlen illesztett görbét eredményezett.

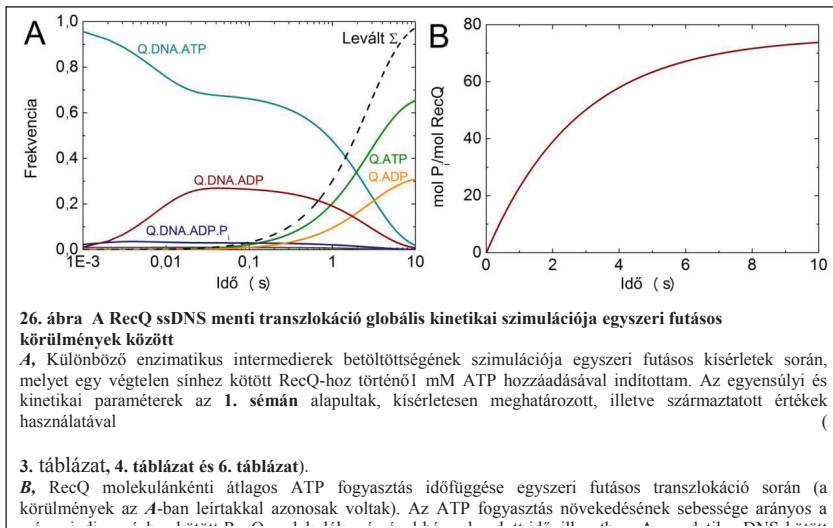
Az illesztett P és b értékek az egyszeri futásos kísérletek (**20. ábra B-C panel**) alapján azonos DxSO_4 koncentráció mellett meghatározott értékeknél valamivel alacsonyabbnak adódott. Míg ezekben az illesztésekben P nem volt robusztusan meghatározható, addig az alacsony illesztett b érték azt jelezte, hogy a dT_{15} és dT_{18} szubsztrátokkal gyűjtött adatpontok a transzlokációtól független események hozzájárulását is tartalmazhatják. Ezt a feltételezést megerősítette, hogy az ATP hiányában végzett kontrollkísérletekben a τ_{obs} értékek dT_{15} és dT_{18} esetén sokkal alacsonyabbak voltak, mint a hosszabb oligo-dT szubsztrátok esetén (**25. ábra D panel**, üres zöld szimbólumok). Továbbá, az ATP jelenléte nem volt igazán nagy hatással a dT_{15} és dT_{18} esetén gyűjtött τ_{obs} értékekre, jelezvén, hogy kevés, vagy semmilyen transzlokáció sem történik e rövid hosszak esetén. Ez a megfigyelés konzisztens a más kísérletek során (**20. ábra** és **23. ábra**) meghatározott 18 nt kötőhely mérettel. Ezért k_{trans} -ot kiszámítottam az illesztett görbe meredekségéből az $L = 18$ nt pontban, mely a transzlokációhoz szükséges DNS hossz alsó határát reprezentálja. Így a meredekség reciprokának feleként $k_{\text{trans}} = 43$ nt/s transzlokációs sebességet számítottam ki, mely a korábbi kísérletekkel összhangban (**20. ábra** és **23. ábra**) k_{trans} -nak egy felső limitet szab (**6. táblázat**).

6. Az enzimmechanizmus modelljének igazolása szimulációval

Ebben a fejezetben publikálatlan eredmények vannak, melyeket az „Allosteric effect of nucleotide on the DNA interaction of RecQ.” (Sarlós, K., Gyimesi, M., Kovács, M (2012)) előkészületben lévő kéziratunkban foglalunk össze.

A RecQ egyszeri transzlokációs profiljait egy globális kinetikai modell (**1. séma**) segítségével szimuláltam, amely az ATP-áz ciklus és a DNS kötés kísérletesen meghatározott paramétereit tartalmazta, termodinamikai megfontolások alapján számolt egyensúlyi állandókkal kiegészítve (**26. ábra**). (A kezdeti ATP koncentrációt kvázi-telítésinek választottam (1 mM). A szimulációban egy egyszeri futás során jelen lévő egyedi enzimátikus állapotok betöltöttségét számítottam ki (feltételezve, hogy ATP-áz ciklusonként 1 nukleotidot tesz meg az ssDNS mentén), melyet a RecQ.DNS komplexet ATP-vel összekeverve indítottam el. A RecQ.DNS.ATP (prehidrolitikus) állapot hamar az egyetlen meghatározó populációvá vált, és a futás során a későbbiekben is a legmeghatározóbb maradt (kb. 65 %), a sebesség-meghatározó kémiai lépés (hidrolízis) következményeként (**26. ábra A panel**). A RecQ.DNS.ADP komplex kis késéssel szintén szignifikánsan populálttá válik, a rövid *steady-state* fázis alatt 20 %-os betöltöttséget elérve. Ennek az oka a P_i felszabaduláshoz képest mérsékelt gyors ADP felszabadulás. Egy rövid (egy másodperces) *steady-state* alakul ki, ami a **26. ábra B paneljén** látható ATP hidrolízis kvázi-lineáris szakaszának feleltethető meg.

Mivel a transzlokáció folyamán főleg a RecQ.DNS.ATP valamint a RecQ.DNS.ADP állapotok voltak populáltak, a disszociációs események nagy része (így a futások befejeződése) is ezekből az állapotokból történik. Az egy másodperces *steady-state* végén a levált RecQ molekulák populációi (RecQ.ATP, RecQ.ADP) kezdenek felhalmozódni, párhuzamosan az ATP fogyasztás telítődésével (**26. ábra**). A szimuláció átlagosan 80 ATP-áz ciklust eredményezett, ami 80 nukleotid átlagos futási hosszának feleltethető meg (**26. ábra B panel**). Ez az érték összhangban van az egyszeri futásos kísérletekből meghatározott értékekkel dT_n esetén (**26. ábra C panel**). Tekintetbe véve, hogy a szimulációnak nem az összes paramétere származik kísérleti eredményekből, a szimuláció eredménye azt tükrözi, hogy az általam javasolt mechanokémiai modell megbízhatóan reprodukálja a működési mechanizmus kvantitatív paramétereit (**6. táblázat**).



EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

I. Univerzális módszer nukleinsav motorok mozgásának kvantitatív jellemzésére

Kidolgoztunk egy módszert, mely változó nukleinsav-hosszok menti egyszeri futás során történő NTP fogyasztás mérése alapján meghatározza a motor aktivitás legfontosabb makroszkopikus paramétereit (NTP hidrolízis és a transzlokáció sebessége ($k_{\text{ATP,trans}}$, k_{trans}), kötőhely méret (b), mechanokémiai csatolási arány (C), egyszeri futás során átlagosan elhidrolizált ATP molekulák száma és a megtett úthossz ($\langle n_{\text{ATP}} \rangle$ és $\langle n_{\text{nt}} \rangle$, **1. táblázat** és **6. táblázat**). A módszer előnye, hogy relatíve egyszerű függvények illesztésével határozhatóak meg a nem-kovariáns paraméterek (*8. egyenlet* és *9. egyenlet*). A kísérletek elvégzéséhez nincs szükség sem az enzim, sem a sín jelölésére, mely csökkenti a műtermékek megjelenésének valószínűségét. A módszer legkézenfekvőbb alkalmazásként felmerül például transzlokázok, helikázok, vagy polimerázok karakterizálása, valamint lehetőséget nyújt különböző körülmények motor aktivitására gyakorolt kvantitatív elemzésére (pl. enzim mutációk, domének törlésének, kötőpartnerek, hőmérséklet, sín szerkezet és szekvencia, inhibitorok, stb. hatása).

Korábbi munkákban több módszer is felmerült nukleinsav motoraktivitások NTP-fogyasztás mérésén alapuló *pre-steady-state* vizsgálatára (9). Az általunk kidolgozott módszer ezekről eltérően számos olyan jelenséget vesz figyelembe, melyeket korábban nem használtak, illetve nem kezeltek megfelelően. Az egyik ilyen különbség, hogy analízisünkben a processzivitást (P_{macr}) globális változóként határozzuk meg, ellentétben a korábbi megfontolásokkal, melyek során mikroszkopikus sebességi állandók (transzlokáció - k_t és disszociáció - k_d) alapján számították ki (**6. ábra**, **1. táblázat**). Az NTP fogyasztás sínhossz-függésének lineáristól való eltérését korábbi munkák során is megfigyelték, ám ezt a jelenséget nem használták alapul a processzivitás meghatározásához (90). Ezen felül a processzivitás csapda koncentráció függésének általunk alkalmazott analízise lehetővé teszi a csapdamentes processzivitási adekvát meghatározását (*13. egyenlet*). Analízisünk további fontos tulajdonsága, hogy a megtett átlagos lépésszámot közelítések helyett explicit összegzésekként kezeli, valamint figyelembe veszi, hogy az enzim a nukleinsav sín végéről vagy random start pozícióból indul. (Itt megjegyzendő, hogy az analízis nem nyújt információt starthely preferenciáról, így azt más, független mérésekkel kell meghatározni.)

Komplikációt jelenthet, hogy szálszétválasztáskor az utolsó néhány bázispár spontán módon is szétválhat, így az utolsó néhány lépés már az ssDNS menti transzlokációt fogja reprezentálni. Ez problémát okozhat az analízisben, ha a transzlokáció kinetikája a

szálszétválasztásától különbözik (97). Ez az eset a végen történő felesleges ATP-áz ciklusok jelenlétére vonatkozó egyenletek alapján elemezhető (*11. egyenlet és 12. egyenlet*). Ez a jelenség bizonytalanáá teszi b meghatározását, ám P_{macr} és C még mindig nagy megbízhatósággal meghatározható.

Az analízis egyik hiányossága, hogy nem tud különbséget tenni uniform (egyforma lépések és NTP fogyasztás minden ciklusban) és nem uniform (az enzim több, különböző NTP-fogyasztó transzlokációs cikluson megy át, melyek közül az egyik sebesség-meghatározó) mechanizmusok között. Ez összefüggésben van Fischer és Lohman azon megállapításával, mely szerint az NTP-fogyasztás függő mérések nem képesek a nem uniform mechanizmusok feloldására, valamint m és c független meghatározására (94). Ennek ellenére az analízisünk által meghatározott makroszkopikus paraméterek a motor aktivitás kulcsfontosságú aspektusait abban az esetben is korrekt módon definiálják, ha egy komplexebb lépési mechanizmus rejlik a háttérben. Abban az esetben, ha a c paraméter egytől különböző, a makroszkopikus processzivitás (P_{macr}) különbözni fog a kinetikai processzivitástól (P) (**1. táblázat**), ám P_{macr} ebben az esetben is használható az átlagosan megtett távolság kiszámítására.

II. A RecQ és BLM helikázok mechanobiokémiai modellje

1. Az ATP-áz ciklus

A RecQ és BLM helikázok ATP-áz ciklusát lépésekre bontva vizsgáltuk. Az eredmények alapján számos hasonlóságot fedeztünk fel, ám jelentős különbségek is mutatkoztak. A hasonlóságok a következők:

- i) Az ATP kötése gyors és reverzibilis mindkét helikáz esetén, ennek kinetikáját a DNS jelenléte nem befolyásolja (**13. ábra; 3. táblázat**).
- ii) A foszfát felszabadulás gyors és irreverzibilis DNS jelenlétében és távollétében is (**15. ábra; 3. táblázat**).

A hasonlóságok mellett jelentős különbségeket fedeztünk fel a mechanizmusban:

- i) A RecQ helikáz ATP-áz ciklusának sebesség meghatározó lépése az irreverzibilis ATP hidrolízis (mely valószínűleg egy szerkezetváltozással kapcsolt folyamat, mely a DNS-kötés erősödését idézi elő), a BLM helikáz ATP-áz ciklusának sebesség meghatározó lépése egy ADP állapotban bekövetkező szerkezetváltozás (**14. ábra; 3. táblázat**). Mindkét esetben a DNS jelentős mértékben gyorsítja a sebesség-meghatározó lépést, ám az továbbra is sebesség meghatározó marad. Mindkét helikáz esetén a szerkezeti átalakulás feltehetően a két RecA-domén elmozdulásához köthető, mely egy DNS menti lépéssel kapcsolt.

ii) Míg RecQ esetén az irreverzibilis hidrolízis lépés sebesség meghatározó, addig a BLM ATP-áz ciklus e lépése gyors és reverzibilis.

iii) A RecQ helikáz ADP kötése gyors, reverzibilis és egyfázisú lépés, míg a BLM helikáz esetén ez kétfázisú, az egyik fázis a már tárgyalt sebesség meghatározó szerkezetváltozás, míg a másik a RecQ ADP kötéséhez hasonló gyors és reverzibilis kötődés (**13. ábra; 3. táblázat**).

A RecQ ATP-áz mechanizmusa sokkal inkább emlékeztet a bakteriális PcrA-ra (81) mint a humán ortológ BLM mechanizmusára. Ez a jelenség azt mutatja, hogy a helikázok biokémiai tulajdonságai az evolúciós leszármazással szemben a biológiai funkciókra való finomhangoltságot tükrözik.

2. Interakció a DNS sínnel

Kimutattam, hogy a RecQ helikáz két lépésben köti a DNS-t, melynek során egy gyors ütközési lépést egy lassú szerkezeti átalakulás követ. Hasonló kétlépéses DNS kötést figyelt meg Lohman és Kowalczykowski a T4 g32 helikáz esetében (110), ahol a gyors fázis egy diffúzió limitált asszociáció volt, a második pedig a szabad fehérjék kooperatív kötődését jelezte a már kialakult fehérje-DNS komplexhez. Méréseim során nem volt megfigyelhető kooperativitás, így ez a magyarázat a RecQ DNS kötésére nem alkalmazható.

A DNS-sel való kölcsönhatást a RecQ által kötött nukleotid nagymértékben befolyásolja (**16. ábra, 18. ábra, 20. ábra; 4. táblázat**). Az *apo* és ADP-kötött RecQ viselkedése hasonló volt, míg a prehidrolízis analóg AMPPNP az interakció erősödését idézte elő. A nukleotid szubsztrát jelenlétének a nukleinsav (DNS, RNS) kötésre gyakorolt hatását már a DnaB (111), a PriA (112) és a Rep (113) helikázok esetén is megfigyelték. Az utóbbi két esetben az AMPPNP kötődése csökkentette a helikáz affinitását a DNS-hez. Az *E. coli* RecQ-n végzett fluoreszcencia anizotrópia mérések a DNS kötés erősödését jelezték AMPPNP jelenlétében (78), bár az effektus csak egy adott AMPPNP koncentráción (1,5 mM) volt detektálható.

A RecQ DNS-sel való kölcsönhatásának legérdekesebb aspektusa a RecQ.ADP.AIF₄ állapot erős DNS-kötő tulajdonsága, mely az ATP hidrolízis átmeneti állapotának, vagy a poszthidrolitikus ADP.P_i állapotnak felel meg. Az ADP.AIF₄ olyan konformáció változást hoz létre a RecQ-ban, mely lelassítja a DNS kötést, és gyakorlatilag megakadályozza a DNS elengedését (**16. ábra és 18. ábra**). Emiatt feltételezhetjük, hogy az ATP hidrolízis egy konformáció változással összekötött folyamat, mely nagy valószínűséggel a DNS-kötő régió záródását idézi elő, mely kapcsolt lehet egy DNS-menti mechanikai lépéssel.

3. A transzlokáció

Az **I.1** fejezetben leírt analízis alapján karakterizáltuk a BLM és a RecQ helikázok ssDNS menti transzlokációját (**9. ábra A panel, 19. ábra**), melyek a következő kulcsjellemzőkkel rendelkeznek:

- i) A helikázok a DNS-hez random módon kötnek (103).
- ii) A *steady-state* k_{cat} és K_{DNS} értékek DNS hosszfüggése, valamint az egyszeri futásos kísérletekből számolt kötőhely méretek (a helikáz által lefedett DNS hossz; *b*) A BLM esetén 12,4-14 nt (**10. ábra B panel és 11. ábra; 6. táblázat**), RecQ esetén pedig kicsit nagyobb, 18 ± 2 nt (**20. ábra B panel és 23. ábra; 6. táblázat**). Mindkét érték valamelyest nagyobb egy másik csoport által korábban meghatározottnál (78,114), ám azok az eredmények egyrészt nem kellőképpen nagy felbontású módszereken alapultak (fluoreszcencia anizotrópia titrálás valamint egy 3 kilóbázis méretű plazmid enzimmel való titrálás hatására bekövetkező mobilitás változásának vizsgálata gél elektroforézissel). Másrészt ellentétben a jelen munkával, ahol a kötőhely méretet több, különböző kísérlet alapján határoztuk meg (**10. ábra, 11. ábra, 20. ábra, 23. ábra**), más munkákban (78,114) ezek az értékek nem voltak több, független szempontból alátámasztva.
- iii) Egy ATP hidrolízis ciklus alatt (mely $k_{\text{ATP,trans}}$ nettó sebességi állandóval történik) a mindkét helikáz egy nukleotid egységet halad az ssDNS mentén (*s*; **10. ábra B panel és 20. ábra B panel; 3. táblázat**), mely araszoló („inchworm”) jellegű transzlokációs mechanizmust jelez. A lépésmérettel reciprokos összefüggésben lévő mechanokémiai csatolási arány ($C = 1$ ATP/nt) mindkét helikáz esetén azonos. Ebben a tekintetben a RecQ és BLM helikázok hasonlítanak az UvrD (9) és PcrA (90) helikázokra, melyek szintén egy ATP molekulát fogyasztanak egy nt megtétele során.
- iv) A k_{cat} értékek DNS hosszától való függése jelzi, hogy az 5' vég elérésekor (ahol az ATP-áz ciklus lelassul $k_{\text{ATP,end-re}}$) a BLM és a RecQ gyorsan leválik a DNS-ről ($k_{\text{off, end}}$; **11. ábra A panel és 23. ábra A panel; 3. táblázat**), elkerülve a felesleges enzimciklusokat, a PcrA helikázhoz hasonló módon (81). Az UvrD helikáz esetén a transzlokáció során ($k_{\text{ATP,trans}}$) és a DNS végén ($k_{\text{ATP,end}}$) történő ATP hidrolízis szinte teljesen megegyezik, így ebben az esetben a k_{cat} értékek nem függenek az ssDNS hosszától, függetlenül attól, hogy az enzim a végén marad-e a transzlokáció befejeztével, vagy sem (9,93,115). A RecQ transzlokáció során $k_{\text{ATP,trans}} = 35 \pm 4 \text{ s}^{-1}$ sebességi állandóval hidrolizálja az ATP-t, mely a szoros mechanokémiai csatolási aránnyal együtt $k_{\text{trans}} = k_{\text{ATP,trans}} / C = 31 \pm 8 \text{ nt/s}$ makroszkopikus transzlokációs sebességet definiál. Ezek az értékek BLM esetén $k_{\text{ATP,trans}} = 33 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ -nak, valamint $k_{\text{trans}} = k_{\text{ATP,trans}} / C = 38 \pm 6 \text{ nt/s}$ -nak adódtak. A RecQ-ra és BLM-re meghatározott $k_{\text{ATP,trans}}$ és k_{trans}

értékek jó egyezésben vannak az irodalomban szereplő szálszétválasztás sebességekkel (114,116), mely jelzi, hogy mindkét helikáz aktív módon választja szét a DNS szálait.

v) A DNS belső régióiról történő disszociáció ($k_{\text{off,int}}$) relatíve lassú, amely BLM esetén mérsékelt, RecQ esetén magasabb transzlokációs processzivitást eredményez (átlagosan 57 nt illetve 100-320 nt-ot megtéve egyszeri futásonként; **(10. ábra C panel és 20. ábra C panel 3. táblázat)**). Ezek az értékek hasonlóak a replikatív PcrA helikáz transzlokációs (297-339 nt; (101)) processzivitásához, valamivel alacsonyabbak a mismatch-javításban részt vevő UvrD transzlokációs processzivitásánál (kb. 2400 nt; (93)) és jóval alacsonyabbak az *E. coli* RecFOR útvonalban RecQ-hoz hasonlóan résztvevő, ún. „chi” szekvenciáknál 3' túlnyúló véget generáló RecBCD helikáznál, mely több ezer lépés megtételére képes (117).

A transzlokációs mechanizmus kapcsán szerkezetileg felmerülő kérdés, hogy a helikáz a DNS cukor-foszfát gerincével vagy a bázisokkal való interakció révén transzlokál. SF1 helikázokról, mint a PcrA, az UvrD vagy a Rep kimutatták, hogy az „inchworm” transzlokációs mechanizmust az ún. hidrofób léptetéssel hozzák létre, mely kapcsolat a nukleinsav bázisok és a fehérje aromás oldalláncai között jön létre (6,7,118). Ezzel ellentétben SF2 helikázokkal (hepatitisz C vírus NS3, és *Archaea* Hel 308) kapcsolatos tanulmányok a fehérje és cukor-foszfát gerinc közti kapcsolatot favorizálják (13,119,120). Szerkezeti szempontból a BLM és RecQ helikázok rendelkeznek mindkét mechanizmus kapcsán fontosnak jósolt szerkezeti elemekkel (121). Egyrészt tartalmaznak egy konzervált triptofánt (BLM: Trp⁸⁰³; RecQ: Trp¹⁵⁴), mely szekvencia-illesztések alapján bázis-léptetési mechanizmushoz szükséges aromás aminosav lehet. Másrészt tartalmaznak egy az SF1 és SF2 helikázok között konzervált motívum V-ben lévő treonint (BLM: Thr⁹⁴⁶; RecQ: Thr²⁹³), mely SF2 enzimek (virális NS3, *Drosophila* VASA és eIF4AIII) kristályszerkezetei alapján a cukor-foszfát gerinccel való kapcsolatban fontos lehet (18,119,122-124). Lehetséges, hogy a RecQ helikázok transzlokációs mechanizmusa kevert, melyben részt vesz a cukor-foszfát gerinccel való kapcsolat és bázisok-aromás aminosavak közti léptetési mechanizmus is. Ezt az elméletet támasztja alá, hogy méréseink szerint a BLM helikáz *steady-state* ATP-áz aktivitását a PTO-módosított oligo dT₉₀ a módosítatlan dT₉₀-hez hasonló mértékben aktiválta, a hozzá tartozó K_{DNS} érték is csak kis mértékben módosult (**11. ábra**). Ezek alapján feltételezhetjük, hogy a transzlokációban döntően szerepet játszik az aromás aminosav-bázis léptetési mechanizmus, de kölcsönhatás alakul ki a cukor-foszfát gerinccel is.

Az „inchworm” mechanizmus szerkezeti alapjául a két RecA domén által kialakított nukleotid kötőzsebben bekövetkező változások szolgálnak, melyek a RecA domének egymáshoz képesti elmozdulását eredményezik, modulálva a DNS interakciót (7,18).

Kísérleteink során a BLM helikáz ATP-áz ciklusa során észleltünk egy lassú izomerizációs lépést, mely az ADP felszabadulást limitálja (**3. táblázat**). Ez a lassú szerkezeti változás lehetséges, hogy a két RecA domén elmozdulásához köthető, mely a DNS menti fizikai lépéssel párosulhat. A RecQ helikáz ATP-áz ciklusa során a hidrolízis lépést azonosítottuk sebesség meghatározónak, valamint az azt követő poszthidrolitikus állapotot egy erősen DNS-re rázárult szerkezetként észleltük (**16. ábra** és **18. ábra**; **3. táblázat**). A RecQ esetén feltehetőleg a hidrolízishez kapcsolt szerkezeti változás szintén a RecA domének elmozdulásával jár, mely a DNS-kötő állapot erősségének változásán keresztül egy mechanikai lépés megtételét eredményezi. Eredményeink rávilágítanak, hogy a két RecA domén által alkotott nukleotid kötéshelyen történő változások hogyan kapcsolódhatnak olyan nagyméretű szerkezeti változásokhoz, mely a DNS-sel való kapcsolat erős illetve gyenge jellegének ciklikus változtatásán keresztül hatékony mechanokémiai csatolást eredményez, megvalósítva ezáltal a processzív transzlokációt a DNS mentén. A RecQ helikázok N-RecA magjában található, úgynevezett aromás-gazdag régióknak kimutatottan jelentős szerepe van a transzlokáció és az ATP-áz ciklus szoros kapcsoltságában (105). Megjegyezendő, hogy az általunk alkalmazott analízis felbontóképessége alapján nem zárható ki egy komplexebb, több ATP-áz ciklust magában foglaló, egy sebesség-meghatározó lépés által jellemzett (úgynevezett nem egyforma (nem uniform) lépéseket tartalmazó mechanizmus, lásd a **II.1** fejezetben) mechanizmus „megbúvásának” lehetősége (94). Ilyen mechanizmusok megfigyelhetők lehetnének olyan, magas jel-zaj arányú módszerekkel, ahol a fluoreszcensen vég-jelölt ssDNS-ek menti transzlokációt követnénk nyomon. Sajnálatos módon ezeket a kísérleteket nem tudtuk elég magas jel-zaj arány mellett kivitelezni a RecQ és a BLM esetén, annak ellenére, hogy számos mérési körülményt és fluoreszcens próbát bevetettünk. Ennek ellenére az általunk meghatározott kulcs makroszkopikus transzlokációs paraméterek érvényesek maradnak abban az esetben is, hogyha egy bonyolultabb mikroszkopikus mechanizmus rejlik a háttérben.

A RecQ helikázok oligomerizációjának foka különböző aktivitások során az irodalomban sokat vitatott kérdés (71,72,75,125,126). Korábbi megfigyelésekkel összhangban (34,105) a RecQ bazális és ssDNS aktivált *steady-state* ATP-áz aktivitásában nem volt megfigyelhető kooperativitás (**12. ábra**). Ez azt jelzi, hogy a RecQ aktív helyek a mérésben alkalmazott körülmények esetén függetlenül működnek ssDNS menti transzlokáció során, nem zárva ki annak lehetőségét, hogy a szálszétválasztó aktivitás vagy a komplex DNS szerkezetek feloldása esetleg oligomer formában történik. A RecQ szálszétválasztó aktivitását vizsgáló tanulmányok azt sejtetik, hogy hatékony szálszétválasztó aktivitás oligomer formában történik

(71,75,125). A jelenséget, hogy transzlokáció monomer formában történik, ám a hatékony szálszétválasztást oligomerek végzik más SF1 és SF2 helikázok, többek között a PcrA (101), az UvrD (93,127-129), a Rep (100,130), valamint az NS3 (131) esetén is megfigyelték. Ez azt sugallja, hogy az oligomerizációnak szerepe lehet a különböző aktivitások közötti váltások szabályozásában. A humán WRN (132) és RecQ1 (133) helikázok esetében szintén kimutattak dinamikus oligomerizációt, mely a szubsztrát hatására végbemenő oligomerizáció potenciális jelentőségét mutatja a RecQ-család esetében is (134). Ezzel összhangban egy másik, a dolgozatban nem szereplő munkánkban (Gyimesi, M., Sarlós, K., Billington, N., Pires, H., Módos, K., Kellermayer M., Kovács M. (2012): *Monomeric Form of the Human Bloom's Syndrome Helicase is Recruited to Various Homologous Recombination Intermediates. - előkészületben*), a BLM esetén kimutattuk, hogy szubsztrát mentes formában különböző fokú oligomerek kevert állapotában léteznek, míg az ssDNS, illetve az ATP kötése a monomerek képződése felé tolja el az egyensúlyt, jelezvén, hogy a transzlokáció monomer formában történik. Bonyolultabb DNS szerkezetek (kettős Holliday-szerkezet, nem-produktív D-hurok) ezzel szemben részleges oligomer képződést indukáltak. Továbbá az oligomerizációt nagy valószínűséggel jelentősen befolyásolják az oldat körülmények (úgy mint a hőmérséklet, az ionerő, a pH stb.). Ebből kifolyólag a különböző irodalmi eredmények összevetésekor, valamint ezek magyarázatakor rendkívül körültekintőnek kell lenni. Összességében a helikázok szubsztrát vezérelte oligomerizációjának részleteit még sok kérdés tekintetében homály fedi, így ez a témakör még számos kutatás alapjául fog szolgálni a jövőben.

Új keletű munkák, melyek szintén a RecQ helikáz transzlokációs mechanizmusát vizsgálták a jelen dolgozatban bemutatott eredményektől némiképp eltérő paramétereket és interpretációt mutattak be (107,135). E munkák és a jelen dolgozat alapjául szolgáló saját munkánk részletes összevetése rávilágított, hogy az eltérésekért nagy valószínűséggel felelőssé tehetőek a különböző kísérleti körülmények. Az alacsonyabb transzlokációs sebesség ($k_{trans} = 14\text{-}26$ nt/s), és így az ebből számolt rövidebb processzív futási hossz (36 nt) alacsonyabb hőmérsékleten lett meghatározva (20 °C, (107)), mint a jelen munkában (25 °C). Ezeket a paramétereket befolyásolhatja továbbá az eltérő fehérje csapda (heparin vs. DxSO_4 a jelen munkában). Az ionerő rendkívül erősen befolyásolhatja az oligomerizációs állapotot, így a nagyobb kötőhely méret (30-34 nt, (107)), valamint a (135) munkában az ssDNS transzlokáció során megfigyelt kooperativitás ($n = 2,1$) a *steady-state* ATP-áz aktivitásban nagy valószínűséggel a (107,135) munkákban alkalmazott jelentősen alacsonyabb ionerőnek

köszönhető. Ezek mellett kiemelendő, hogy a jelen dolgozatban alkalmazott analitikus módszerek jelentősen különböznek azoktól, melyek korábbi tanulmányok során alkalmaztak.

A RecQ helikázok a HR korai és késői szakaszában is fontos szerepet játszanak (**1. ábra**, (1)). A RecQ helikáz a RecJ endonukleázzal együttműködve hozza létre a 3' túlnyúló véget, mely a RecA rekombináz által vezérelt szálinvázió során a homológia keresésben részt vesz (67,68). A RecQ processzív működése fontos lehet abban, hogy elég hosszú 3' DNS szakasz jöjjön létre a homológia kereséshez ahhoz, hogy az illegitim rekombináció nagy valószínűséggel elkerülhető legyen. A RecQ az SSB és a RecA (hasonlóképpen a BLM az RPA és a Rad51) együttműködése vezérli a HR intermedierek keletkezését és szétválasztását (66). Az illegitim rekombináció RecQ (65) és BLM (65) általi szupressziója a HR minőségellenőrzési lépése során e helikázok egyik legfontosabb *in vivo* feladata. Emellett mindkét helikáz szerepet játszik az elakadt replikációs villák feldolgozásában (136). A RecQ közepesen nagy processzivitása ezekben a folyamatban is fontos lehet, annak érdekében, hogy az intermediereket teljes hosszukon szétválassza. A BLM processzivitása adataink alapján alacsonyabb, viszont a BLM a humán DNS-manipuláló fehérjék többségéhez hasonlóan nagy komplexben dolgozik, mely a processzivitás növekedését idézheti elő.

A dolgozatban bemutatott mechanisztikus betekintés lehetővé teszi a RecQ és a BLM molekuláris működésének mélyebb megértését, mely alapjául szolgál komplex biológiai feladataik, például a homológ rekombináció alaposabb megismeréséhez.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

I. Anyagok

Minden anyag a Sigma-Aldrich-tól származott, kivéve azok, melyeknél külön említésre került a gyártó. A P_i sztenderdet a Merck, az ATP-t, az ADP-t, az AMP.PNP-t a Roche Applied Science, az mdATP-t a Jena Bioscience, a γ - ^{32}P -ATP-t az Izotóp Intézet szállította. Az mdADP mdATP prehidrolízisével lett előállítva, oly módon, hogy 0.5 μ M nyúl izom szubfragment-1 és 1 mM mdATP keverékét SF50 pufferben (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 1 mM DTT; 5 mM $MgCl_2$) 25°C-on 16 órán át inkubáltam. (Ez az oldat minimum tizenötszörösére hígult a kísérleti összeállításokban.) Oligonukleotidokat (dT₇₋₉₀) a VBC-Biotech az Invitrogen és a Merck szállította. Az értekezésben a DNS koncentrációk oligonukleotid és polinukleotid molekula egységekben vannak kifejezve. Koncentrációjuk meghatározása oligo dT-k esetén az $\epsilon_{260} = 8400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nt}^{-1}$ és M13 esetén az $\epsilon_{260} = 4,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ extinkciósoefficiensek segítségével történt. A poli-dT a Sigma Aldrich-tól származott, a koncentrációját az $\epsilon_{260} = 8400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{nt}^{-1}$ extinkciósoefficiens alapján határoztuk meg. Elektroforetikus analízisünk alapján a poli-dT szubsztrát átlagos hossza 1000 nt felett volt.

II. Klónozás, fehérjetermelés és tisztítás

1. RecQ és BLM

A teljes hosszúságú RecQ fehérjét kódoló régiót PCR reakció során GoTaq (Promega) polimerázzal amplifikáltam *E. coli* genomiális DNS-ből (*E. coli* K12-MG1655). Az upstream és downstream oligonukleotidok NcoI és LglI (Fermentas) restrikciós felismerő helyeket tartalmaztak. A PCR terméket pTXB3 plazmidba (New England Biolabs, NEB) az NcoI és LglI klónozó helyek közé inszertáltam (Intein-kitinkötő fehérje expressziós rendszer). A konstrukciót szekvenálással ellenőriztettem. A fehérjetermelés *E. coli* B ER2566 (NEB) sejtben, 2YT táptalajban (16 g/l pepton (Oxoid), 5 g/l élesztő kivonat (Oxoid), 5 g/l NaCl), 200 μ g/ml Ampicillin mellett történt. A transzformált sejt kultúrát 37 °C-on növesztettem, majd 600 nm-en 0,3-as elnyelés elérésekor 18 °C-ra hűtöttem, 0,2 mM IPTG-vel (Izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid) történő indukció után 16 órán át inkubáltam. A sejteket centrifugálással összegyűjtöttem, CH-pufferben (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10 % glicerin; 0,1 % Triton-X-100) homogenizáltam és ultrahang segítségével feltártam. A sejt extraktumot 10 ml-es kitin affinitás oszlopra (NEB) vittem fel, majd az aspecifikusan kötött fehérjét CH pufferrel mostam le. A RecQ elúciója 50 mM DTT (CH

pufferben) segítségével létrehozott redukáló környezetben történt. A redukáló környezetben az intein önhasítása következtében a kitinkotó fehérje az oszlopon marad, míg a RecQ járulékos aminosavak nélkül leválik. További tisztítást végeztem 5 ml-es HiTrap Heparin (GE Healthcare) oszlop segítségével, mely a DNS-szerkezetét mimikálva köti a RecQ-t. Evvel a lépéssel további fehérjéktől illetve a DNS-től szabadultam meg. A RecQ-t sógradiens (50 ml, 200 mM – 1M NaCl) segítségével HP pufferben (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10 % glicerín; 200 mM NaCl) eluáltam. A fehérjét egy éjszakán át St pufferben (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM DTT; 10 % glicerín; 200 mM NaCl) dializáltam. A RecQ tisztaságát SDS-PAGE segítségével ellenőriztem. A koncentrációmérést Bradford reagens 595 nm-en történő elnyelésének mérésével, BSA sztenderdhez viszonyítva végeztem. A fehérjét folyékony nitrogénben cseppenként fagyasztottam és tároltam.

A BLM rövid, ún. „helikáz moduljának” (mely a 642-1290-es aminosavakat tartalmazza) klónozása a RecQ-hoz hasonló módon történt Gyimesi Máté által. A fehérje termelés és tisztítás megegyezik a RecQ-nál alkalmazott módszerekkel, kivéve, hogy a termeléshez *E. coli* BL21 Rosetta sejtet használtunk, illetve még egy tisztítási lépést alkalmaztunk (5 ml-es HiTrap CM FF ionszere oszlop, CM pufferben (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10 % glicerín; 150 mM NaCl), az elúció 20 ml-es 150 mM – 1 M sógradiens segítségével történt).

Ez a típusú termelés mindkét fehérje esetén 1-2 mg tiszta (> 95%) fehérjét eredményezett kultúra literenként.

2. Foszfátkötő fehérje (PBP)

A transzformált, foszfátkötő fehérjét kódoló (*phos* A197C) plazmidot tartalmazó sejteket (ANCC75) 12 µg/ml Tetraciklint tartalmazó magas foszfáttartalmú (640 µM) minimál táptalajban növesztettem. A sejteket $A_{600} = 2$ elnyelésnél összegyűjtöttem, majd alacsony foszfáttartalmú (64 µM) minimál táptalajban növesztettem tovább 16 órán át 37 °C-on. A táptalaj alacsony foszfáttartalma váltotta ki a foszfátkötő fehérje túltermelését. (A minimál táptalaj összetétele: 120 mM Tris-HCl pH 7,2; 80 mM NaCl; 20 mM KCl; 20 mM NH₄Cl; 3 mM Na₂SO₄; 2 g/l glükóz; 10 µM FeSO₄; 0,2 mM MgSO₄; 0,2 mM CaCl₂; 100 mg/l Arginin; 50 mg/l Leucin; 40 mg/l Hisztidin; 30 mg/ml Triptofán; 20 mg/l Metionin; 20 mg/ml Adenozin.) A sejteket centrifugálással összegyűjtöttem, majd TN1 pufferben (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 30 mM NaCl) mostam. A feltárást ozmotikus roncsolással végeztem, a sejteket először magas cukortartalmú pufferrel (30 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,1 mM EDTA; 20% szacharóz) inkubáltam, majd összegyűjtés után gyorsan vízben vettem fel. A sejt extraktumot

100 ml-es Q-Sepharose FF oszlopon ioncsere kromatográfiával tisztítottam, és sógradienssel (11; 0-200 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1mM MgCl₂) eluáltam.

Az eluált fehérjét 100 µM-os töménységűre koncentráltam, és foszfátmentesítettem MOP (1 egység/µl bakteriális purin-nukleotid-foszforiláz (PNP), 30 mM 7-metil-guanozin (7MG)) segítségével, majd feljelöltem 150 µM-os MDCC-vel (7-dietilamino-3-(((2-malemidil)etil)amino)karbonil)kumarin) 30 percen át.

A jelölt fehérjét tovább tisztítottam 50 ml-es Q-Sepharose FF oszlopon, az MDCC-PBP-t sógradienssel (600 ml; 0-50 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,0) eluáltam. Az eluált MDCC-PBP-t koncentráltam, majd cseppenként fagyasztva folyékony nitrogénben tároltam. A koncentrációmérést az $\epsilon_{280,PBP} = 1,78 \text{ (mg/ml)}^{-1}\text{cm}^{-1}$, és az $\epsilon_{436,MDCC} = 46 \text{ 800 M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ extinkciós együtthatók alapján végeztük. A fehérje tisztaságát SDS-PAGE-el ellenőriztük. Sejt kultúra literenként 30-50 mg tiszta fehérje (> 95%) volt kinyerhető.

III. Tranziens enzimkinetikai vizsgálatok

Minden mérés SF50 pufferben (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM DTT), történt 25 °C-on, kivéve ahol a hőmérséklet külön említésre kerül. A stopped-flow kísérleteket KinTek SF-2004 és BioLogic SFM 300 készülék segítségével végeztem, a quenched-flow kísérleteket KinTek RQF-3 készülék segítségével. Minden kísérlet esetén az összekeverés utáni koncentrációk vannak feltüntetve. Azokban a kísérletekben, melyeknél ez szükséges volt, az esetleges nukleotid szennyezést oly módon távolítottuk el, hogy a mintákat előinkubáltuk 0,02 U/ml apirázzal 25°C-on 15 percig.

Az ATP-ről történő foszfát (P_i) felszabadulást fluoreszcensen jelölt foszfátkötő fehérjével követtük (MDCC-PBP) nyomon ((23,89,90,94,95,97,99,101)) 436 nm-es gerjesztésnél 455-ös felül áteresztő filteren keresztül. A mérések mindig P_i megjelenésében történtek (150 mM 7-metilguanozin, 0,1 U/ml purin nukleozid foszforiláz). Az MDCC-PBP fluoreszcencia felszabadult foszfát mennyiséggé számítását kalibrálás segítségével oldottam meg (**10. ábra D panel**). A kalibrálás során ismert mennyiségű foszfátot tartalmazó mintákat keverünk össze a stopped-flow-ban, a kísérletben később alkalmazandó mennyiségű MDCC-PBP-vel. Az MDCC-PBP foszfátkötésére egyfázisú exponenciális illesztünk, melynek amplitúdója korrelál a megkötött foszfát mennyiségével. Ezeket az amplitúdókat a foszfátkoncentráció függvényében ábrázoljuk, a kapott pontokra egyenest illesztünk. Az így kapott egyenes meredekségéből kiszámítható, hogy a kísérletek során a fluoreszcencia intenzitás változása mekkora mennyiségű felszabadult foszfátnak felel meg. Az egyszeri futásos kísérletek leírása az „Eredmények” I-II. fejezetében kerül kifejtésre.

Triptofán fluoreszcenciát 340 nm-es interferencia filterrel 297 nm-es gerjesztésnél, illetve 280 nm-es gerjesztés esetén 320 nm-es felül áteresztő filterrel detektáltam. Az mdATP-t és az mdADP-t fluoreszcenciát 280 nm-es gerjesztésnél 420 nm-es felül áteresztő filterrel detektáltam kihasználva a mant és a RecQ aromás aminosavai és a mant közti FRET jelenséget.

IV. Steady-state ATP-áz mérések

A kísérleteket 50 µg/ml BSA-val kiegészített SF50 pufferben végeztem. A méréseket piruvát-kináz – laktát-dehidrogenáz (PK/LDH) kapcsolt reakció segítségével végeztem (14 U/ml PK, 20 U/ml LDH, 1 mM ATP, 1 mM foszfoenol piruvát (PEP), 200 µM NADH (redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid)), 25°C-on. A NADH-NAD átalakulást kísérő abszorbanciaváltozást ($\epsilon_{340\text{ nm}} = 6220\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) Shimadzu UV-2101PC spektrofotométerrel 340 nm-en követtem nyomon.

V. Egyensúlyi fluoreszcencia spektroszkópai vizsgálatok

A RecQ triptofánok fluoreszcencia változását SPEX Fluoromax spektrofluoriméterrel vizsgáltam. A méréseket 10 % glicerinnel kiegészített SF50 pufferben végeztem. A RecQ.ADP.AIF₄ komplexet úgy hoztam létre, hogy 3 µM RecQ-t és 1 mM ADP-t gyorsan összekevertem 1 mM AlCl₃-dal és 5 mM NaF előkeverékével, and majd három órán át jégen inkubáltam. A triptofánokat 297 nm-en gerjesztettem, az emissziós spektrumot 305 nm és 420 nm közötti tartományban 0.5 nm-es felbontással detektáltam. Az alkalmazott gerjesztési hullámhosszon (297 nm) a DNS-nek még mindig jelentős elnyelése van, mely a DNS koncentráció emelkedésével egyre több és több gerjesztő fényt nyel el. Emiatt a triptofánok gerjesztettsége a DNS koncentráció emelésével csökken. Ezt a jelenséget belső szűrő hatásnak nevezzük. A DNS 297 nm-es gerjesztésnél jelentkező belső szűrő hatását egy DNS-el kölcsönhatásba nem lépő, ám a Trp fluoreszcenciát jól modellező anyaggal, N-acetil-triptofán-amiddel (NATA) vizsgáltam. A belső szűrő hatás a DNS koncentráció növelésével a Lambert-Beer törvényt követve exponenciális lefutást mutatott ($y = 0,49 \cdot e^{-x/6,5} + 0,48$). A RecQ Trp fluoreszcencia spektrumok normalizált DNS koncentráció függését ezzel a hatással korrigáltam.

VI. Oxigén kicserélődéses kísérletek

1 µM RecQ és 1 mM ATP keverékét DNS (2 µM dT₅₄) jelenlétében, illetve anélkül, 46 % ¹⁸O-jelölt vizet tartalmazó SF50 pufferben inkubáltam. Az inkubáció hossza DNS-t tartalmazó

minták esetén 30 perc, DNS mentes minták esetén pedig 4 óra volt, annak érdekében, hogy az ATP teljes hidrolízisét elérjem. Ezután a mintákat kétszeresükre hígítottam 10 % aktív szén vizes oldatával, majd 14 krpm fordulatszámon centrifugáltam 1 percen át 25 °C-on, hogy a fehérjét és a nukleotidokat eltávolítsam. A felülúszót desztillált vízzel egyensúlyba hozott DOWEX oszlopra vittem fel. A foszfátot 10 mM sósavval eluáltam, majd liofilizáltam. A minták ezek után tömeg spektrometriával kerültek azonosításra. A víz ^{18}O tartalmát PCl_5 hidrolízise során a foszfátba beépült ^{18}O mennyiségének mérésével ellenőriztük.

A tömeg spektrometriát Kele Zoltán végezte. A tömeg spektrometriához használt készülék egy mikroeletrospray ionforrással felszerelt Waters/Micromass Q-TOF Premier (Waters/Micromass, Manchester, UK) tömeg spektrométer volt. A mintákat MilliQ vízben vettük fel, és 20-szorosára hígítottuk metanollal. A hígított mintákat arannyal burkolt boroszilikát üveg nanospray kapilláris hegyekbe töltöttük. A mérések során a spray feszültség 1kV-ra volt állítva. A készüléket negatív ion módban működtetve ^{18}O -nel különböző mértékben kicserélődött H_2PO_4^- ionokat detektáltunk 97, 99, 101, és 103 m/z arányoknál. A különböző izotópusos H_2PO_4^- speciesek moláris eloszlását a csúcsok intenzitása alapján számoltuk ki.

VII. Adatok elemzése

Az adatok elemzését, illesztéseket és szimulációkat OriginLab 8.0 (Microcal Corp.), KinTek SF-2004, Gepasi v3.30, és KinTek Global Kinetic Explorer szoftverek segítségével végeztük. A közölt értékek átlagok \pm standard hiba 3 illetve 6 kísérletből származó értékek alapján.

ÖSSZEFOGLALÁS

A genom épségének fenntartása az élő szervezet számára esszenciális folyamat. A normális sejtműködés során a DNS-t számos károsodás éri, melyek jelenléte rengeteg kockázattal jár (a káros mutációk felhalmozódása, a replikáció megakadása, nagymértékű genom-átrendeződések, vagy akár sejthalál). Ezen hibák kijavítására konzervált, specifikus javító mechanizmusok jöttek létre, melyekben dedikált enzim komplexek vesznek részt. Az egyik legtoxikusabb DNS hiba a kettős száltörés, melynek hibamentes, információmegőrző javítása a homológ rekombináción alapuló mechanizmussal valósul meg. Ebben a folyamatban vesznek részt a minden élő organizmusban előforduló RecQ helikázok.

A helikázok olyan enzimek, melyek NTP hidrolízisből származó energiát a nukleinsav (DNS, RNS) sín mentén történő mozgássá alakítják (transzlokáció), miközben kettősszálú nukleinsavak szálait egymástól elválasztják. A RecQ helikázok ATP-függő egyszálú (ss) DNS menti egyirányú transzlokációt használnak kettősszálú DNS szálainak szétválasztására. A család baktériumoktól az emberig képviselteti magát. Az ötből három humán forma funkcióvesztéses mutációja súlyos, örökletes autoszómás megbetegedésekhez (Bloom-, Werner-, Rothmund-Thomson-szindróma) vezet, melyek közös jellemzője a rákos megbetegedésekre való erőteljes hajlam. A RecQ helikázok biológiai feladatairól már számos információval rendelkezünk, ám az ezek alapjául szolgáló molekuláris működési mechanizmus még kevésbé ismert.

Munkánk során kidolgoztunk egy általános módszert, mely bármely NTP-függő, nukleinsav sín mentén mozgó motor mechanokémiai jellemzésére alkalmas. Ezzel a módszerrel karakterizáltuk a humán Bloom szindróma helikáz (BLM), valamint az *E. coli* RecQ helikáz ssDNS menti processzív transzlokációját. Az analízisből kiderült, hogy mindkét enzim ún. „inchworm” mechanizmussal transzlokál, lépésenként egy nukleotid (nt) egységet tesz meg, mely alatt egy ATP molekulát fogyaszt el, valamint a RecQ által átlagosan megtett út kicsit nagyobb (100-320 nt), mint a BLM által megtett (57 nt). Lépésenként vizsgáltuk a RecQ és a BLM ATP-áz ciklusának jellemzőit. Ennek kulcsparamétere a sebesség-meghatározó lépés, mely BLM esetén az ADP felszabaduláshoz kapcsolt konformáció változás, RecQ esetén pedig a kémiai lépés. Kinetikai kísérleti eredményeink alapján létrehoztunk egy mechanokémiai modellt a BLM ATP-áz, valamint a RecQ DNS-interakcióhoz kapcsolt ATP-áz ciklusáról, illetve felderítettük, hogy ez a mechanizmus hogyan eredményez processzív DNS-menti transzlokációt. Ezekkel az eredményekkel közelebb kerültünk a homológ rekombináción alapuló DNS hibajavítás mechanizmusának megértéséhez.

SUMMARY

Maintenance of genome integrity is essential for life. DNA is exposed to several damaging agents during normal cell functioning, which can lead to serious problems including malfunctioning of the replication apparatus, large-scale genome rearrangements or cell death. Living systems have developed evolutionarily conserved, specific DNA repair pathways coordinated by dedicated enzyme complexes. One of the most toxic forms of DNA damage is the double-stranded break, which is repaired error-free by homologous recombination based pathways. The ubiquitous RecQ family helicases are key players in this process.

Helicases utilize the chemical energy of NTP hydrolysis to mechanical movement along the nucleic acid (DNA, RNA) track (translocation) in order to separate the strands of the double-stranded (ds) DNA from each other (unwinding). RecQ helicases are ATP-dependent single-stranded (ss) DNA translocases which unwind dsDNA. RecQ family helicases are widespread from bacteria (*E. coli* RecQ) to humans (five different enzymes). Loss-of-function mutations of three of the five human forms cause severe autosomal hereditary diseases (Bloom's-, Werner's and Rothmund-Thomson-syndromes), all of which are associated with high cancer predisposition. Although the biological functions of RecQ helicases are widely described, the mechanistic knowledge of the underlying molecular process is still scarce.

We developed a streamlined method to study the mechanism of any NTP-driven nucleic acid motor. Based on this method, we characterized the ssDNA translocation of the human Bloom syndrome helicase (BLM), and the *E. coli* RecQ helicase. Both helicase translocate processively along ssDNA with an inchworm-type mechanism consuming one ATP upon travelling one nucleotide (nt), with an average run length of 100-320 nt for RecQ and a slightly lower (57 nt) for BLM. We dissected the ATPase cycle of RecQ and BLM to individual steps. The rate-limiting step of the cycle is a conformational change coupled to ADP release in the case of BLM, and to the chemical hydrolysis step in the case of RecQ helicase. Based on the experimentally determined parameters, we constructed the mechanochemical model of the ATPase mechanism of BLM and the DNA-coupled ATPase mechanism of RecQ, and revealed how this mechanism produces processive translocation. These results lead us to a deeper understanding of the molecular basis of the homologous recombination-based DNA repair processes.

TÁBLÁZATOK

1. táblázat: Az analízisben használt paraméterek

Paraméter	Egység	Leírás	Kapcsolat más paraméterekkel
L	[nt]	Sínhossz (nt = nukleotid egység)	
b	[nt]	Kötőhely méret	
C	[nt ⁻¹]	Mechanokémiai kapcsoltság ([NTP hidrolizált]/ [enzim]/ megtett nt)	$C = k_{\text{ATP,trans}}/k_{\text{trans}} = c/m$
$k_{\text{ATP,trans}}$	[s ⁻¹]	<i>Steady-state</i> NTP hidrolízis sebesség a transzlokáció során ([NTP hidrolizált]/ [enzim]/s)	$k_{\text{ATP,trans}} = Ck_{\text{trans}} = c(k_t + k_d)$ ($k_t + k_d$ = a kinetikai lépés nettó sebességi állandója)
k_{trans}	[nt s ⁻¹]	makroszkopikus transzlokációs sebesség	$k_{\text{trans}} = k_{\text{ATP,trans}}/C = m(k_t + k_d)$
c	-	kapcsoltsági sztöchiometria ([NTP hidrolizált]/ [enzim]/)	$c = mk_{\text{ATP,trans}}/k_{\text{trans}} = Cm$
m	[nt]	kinetikai lépésméret (megtett nt/ kinetikai lépés)	$m = ck_{\text{trans}}/k_{\text{ATP,trans}} = c/C$
P	-	Kinetikai processzivitás (a következő lépés megtételének valószínűsége)	$P = k_t/(k_t + k_d)$
P_{macr}	-	Makroszkopikus processzivitás, kiszámítható belőle: – Egyszeri futás alatt átlagosan elfogyasztott NTP molekulák száma (végtelen sínhossz esetén) $\langle n_{\text{ATP}} \rangle = P_{\text{macr}}/(1 - P_{\text{macr}})$ – Egyszeri futás során átlagosan megtett út (végtelen sínhossz esetén) $\langle n_{\text{nt}} \rangle = P_{\text{macr}}/(1 - P_{\text{macr}})/C$	$P_{\text{macr}} = \frac{cP}{1 + cP - P}$ (lásd még 10. egyenlet)

2. táblázat: Az NTP hidrolízis amplitúdók sín hossz függésére illesztett NLLS illesztések pontossága

Paraméter készlet	#1	#2	#3	#4	#5	#6
Kezdőpont	végéről	random	random	random	random	random
NLLS illesztésnél használt egyenlet	8. <i>egyenlet</i>	9. <i>egyenlet</i>	9. <i>egyenlet</i>	9. <i>egyenlet</i>	9. <i>egyenlet</i>	9. <i>egyenlet</i>
k_t (s ⁻¹)	10	10	100	10	10	10
k_d (s ⁻¹)	0,5	0,5	0,5	2	5	0,5
b (nt)	10	10	10	10	10	10
b (nt, legjobban illő)	9,958	9,950	10,002	9,875	9,894	9,799
Eltérés (%)	-0,42	-0,50	0,020	-0,25	-1,1	-2,0
C (nt ⁻¹)	1	1	1	1	1	0,25
C (nt ⁻¹ , legjobban illő)	1,00008	1,005	1,002	1,046	1,288	0,2512
Eltérés (%)	0,0080	0,47	0,20	4,6	29	0,48
P_{macr}	0,95238	0,95238	0,99502	0,83333	0,66667	0,95238
P_{macr} (legjobban illő)	0,95244	0,95226	0,99488	0,83284	0,66508	0,95226
Eltérés (%)	0,0063	-0,013	-0,014	-0,069	-0,24	-0,013
Átlagos futási hossz végtelen hosszú sínen (nt, lásd 1. táblázat)	20	20	200	5	2	80
Átlagos futási hossz végtelen hosszú sínen (nt, legjobban illő)	20,02	19,85	193,9	4,763	1,542	79,41
Eltérés (%)	0,13	-0,74	-2,9	-4,7	-23	-0,74

Egyszeri futások körülmények alatti NTP hidrolízis időfüggésének szimulációi (példák **7. ábra B panel 2. táblázat**) a **7. ábra A paneljén** látható kinetikai modell alapján történtek. A bemeneti paraméterek félkövérrel kiemelve, a szimulációk során variált paraméterek dőlttel kiemelve.

3. táblázat: A RecQ és a BLM ATP-áz ciklusának paraméterei

	A meghatározás módja	Érték			
		RecQ		BLM	
		DNS mentes	DNS jelenlétében	DNS mentes	DNS jelenlétében
k_1 ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	mdATP	$8,0 \pm$	$8,4 \pm 0,5$	$5,5 \pm$	$6,9 \pm 0,7$
k_{-1} (s^{-1})	mdATP	118 ± 8	78 ± 7	$140 \pm$	120 ± 10
k_2 (s^{-1})	Quenched-flow	$\sim 0,2$	~ 30	-	-
	MDCC-PBP	-	-	> 100	> 100
k_3 (s^{-1})	MDCC-PBP	> 100	> 100	> 100	> 100
k_{4i} (s^{-1})	mdADP „chasing”	-	-	0,38	$5,3 \pm 0,6$
k_{-4i} (s^{-1})	mdADP „chasing”	-	-	0,4	≈ 2
k_4 (s^{-1})	mdADP „chasing”	67 ± 5	76 ± 10	29	270 ± 30
	mdADP kötés	104 ± 8	102 ± 8	-	110 ± 30
k_{-4} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	mdADP kötés	$4,5 \pm$	$4,4 \pm 0,4$	-	10 ± 1

4. táblázat: A RecQ kétlépéses DNS kötésének paraméterei

	A meghatározás módja ^a	nukleotid mentes	ADP	AMPPNP	ADP.AIF ₄
Gyenge kötés					
k_{+W} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	dT ₅₄ kötés	420 ± 90	490 ± 30	270 ± 30	41 ± 4
k_{-W} (s^{-1})	dT ₅₄ kötés	140 ± 110	140 ± 20	88 ± 19	10 ± 7
K_W (μM)	k_{-W}/k_{+W}	0,33	0,29	0,33	0,24
Gyenge-erős átmenet					
k_{+WS} (s^{-1})	dT ₅₄ kötés	$6,3 \pm 10$	11 ± 6	$2,9 \pm 3$	$2 \pm 0,3$
k_{-WS} (s^{-1})	dT ₅₄ kötés	$2,2 \pm 3,3$	$6,7 \pm 2,7$	$0,3 \pm 0,5$	$< 0,01$
K_{WS}	k_{+WS}/k_{-WS}	2,9	1,6	9,7	> 200
K_{eq} (μM)	$K_W/(1+K_{WS})$	0,086	0,11	0,031	$< 0,001$
k_{off}	DxSO ₄ „chasing”	$5,5 \pm 0,3$	25 ± 1	$0,5 \pm 0,03$	$< 0,01$
f_W^b	dT ₅₄ kötés	0,68	0,54	0,72	0,69
f_S^c	dT ₅₄ kötés	0,28	0,43	0,34	$< 0,36$

^a A jel minden esetben a RecQ első Trp fluoreszcencia változása volt. A paraméterek jelentése az 1. sémán látható.

^b A gyengén DNS-kötött RecQ Trp fluoreszcencia szintje (A DNS-mentes állapothoz képest; lásd még 17. ábra, 5. táblázat).

^c Az erősen DNS-kötött RecQ Trp fluoreszcencia szintje (A DNS-mentes állapothoz képest; lásd még 17. ábra, 5. táblázat).

5. táblázat: A RecQ dT₅₄ kötésekor történő Trp fluoreszcencia változások gyors és lassú fázisaihoz tartozó relatív amplitúdók telítési DNS koncentrációknál

Nukleotid állapot	apo	ADP	AMP.PNP	ADP.AIF ₄
A_{gyors}	0,32	0,46	0,28	0,31
$A_{\text{lassú}}$	0,30	0,07	0,34	0,33

Az $A_{\text{lassú}}$ értékeket az $A_{\text{totál}}$ és A_{gyors} különbségéből számoltam a **17. ábra** alapján. Kiemelendő, hogy az erős (f_s) és gyenge (f_w) DNS kötő állapotok fluoreszcencia szintjei különbözöek (lásd még **4. táblázat**). Az egyes állapotokhoz tartozó fluoreszcencia szintek a mért amplitúdók és sebességi állandók alapján számolható a következő módon:

$$K_{WS} = \frac{\alpha_S}{\alpha_W} \quad 18. \text{ egyenlet}$$

$$\alpha_S + \alpha_W = 1 \quad 19. \text{ egyenlet}$$

$$f_W = 1 - A_{fast} \quad 20. \text{ egyenlet}$$

$$f_{eq} = 1 - A_{fast} - A_{slow} = \alpha_W f_W + \alpha_S f_S = \frac{f_W}{1+K_{WS}} + \frac{f_S K_{WS}}{1+K_{WS}} \quad 21. \text{ egyenlet}$$

Ahol α_S és α_W az erős és gyenge DNS kötő állapotok frakcionális betöltöttsége telítési DNS koncentráció mellett, az egyensúly elérése után, K_{WS} pedig az erős-gyenge átmenetet jellemző egyensúlyi állandó (**4. táblázat**)

6. táblázat: A RecQ és a BLM ssDNS menti transzlokációjának paraméterei

Paraméter	A meghatározás módja	Érték	
		RecQ	BLM
$k_{\text{ATP,trans}}$ (A transzlokáció alatti <i>steady-state</i> ATP hidrolízis sebességi állandó, s^{-1})	PK/LDH kapcsolt reakció MDCC-PBP	35 ± 4	33 ± 2 27 ± 2
$k_{\text{ATP,end}}$ (<i>steady-state</i> ATP hidrolízis sebességi állandó az 5'-végen, s^{-1})	PK/LDH kapcsolt reakció	14 ± 2	$5,6 \pm 0,5$
$k_{\text{off, end}}$ (A disszociáció sebességi állandója az 5'-végről, s^{-1})	PK/LDH kapcsolt reakció	4 ± 1	$2,7 \pm 0,3$
C mechanokémiai kapcsoltság (ATP hidrolizált / megtett nukleotid, nt^{-1})	MDCC-PBP	$1,1 \pm 0,16$	$0,87 \pm 0,08$
s ($= 1/C$, Transzlokációs lépésméret, nt)	PK/LDH kapcsolt reakció	$0,91 \pm 0,13$	$1,1 \pm 0,1$
b (Kötőhely méret, nt)	MDCC-PBP PK/LDH kapcsolt reakció	18 ± 2	$12,4 \pm 0,14$
k_{trans} ($=k_{\text{ATP,trans}}/C$, makroszkopikus transzlokációs sebesség, nt/s)	MDCC-PBP PK/LDH kapcsolt reakció Trp fluoreszcencia	31 ± 8 $27-43$	38 ± 6 31 ± 5
P (Processzivitás: a következő transzlokációs lépés megtételének valószínűsége)	MDCC-PBP	$0,991-0,997$	$0,98$
$\langle n_{\text{ATP}} \rangle$ ($= P/(1-P)$, egyszeri futás során átlagosan elhidrolizált ATP molekulák száma)	MDCC-PBP PK/LDH kapcsolt reakció Trp fluoreszcencia	$110-350$	50
$\langle n_{\text{nt}} \rangle$ ($= \langle n_{\text{ATP}} \rangle / C$, átlagos futási hossz, nt)	MDCC-PBP PK/LDH kapcsolt reakció Trp fluoreszcencia	$100-320$	57

7. táblázat: A speciesek kezdeti koncentrációi a 22. ábra szimulációiban (μM -ban feltüntetve)

	Analitikus kísérletek (22. ábra)	Kontroll kísérletek (22. ábra)
[E]	0	0,01
[DNA]	0,09	0,1
[E.DNA]	0,01	0
[Cspda]	0,2-51,2 (logaritmus növekedés)	0,2-51,2 (logaritmus növekedés)

A fel nem tüntetett speciesek kezdeti koncentrációja nullára volt állítva.

8. táblázat: A 22. ábra által bemutatott kinetikai sémából származó eredendő és a szimulált processzivitás értékekre illesztett paraméterek

	Eredendő	Illesztett
P_0 (csapda-mentes processzivitás)	0,990	0,985
P_T (processzivitás telítési csapdakonzentrációnál)	0,800	0,733
K_d' (μM)	8,25	12,0

Ahol P_0 a csapdamentes és P_T a telítési csapda koncentrációhoz tartozó processzivitás értékek, K_d' pedig a csapda-enzim kapcsolatot jellemző látszólagos disszociációs állandó (az analízist lásd még az I.1 fejezetben; 13. egyenlet).

ÁBRAJEGYZÉK

Ábra	Cím	Oldal
1. ábra	A DNS kettős száltörés homológ rekombináción alapuló javításának modellje	6
2. ábra	Három különböző családból származó helikáz kristályszerkezete.	9
3. ábra	A RecQ helikázok szerkezeti elemeinek konzerváltsága.	11
4. ábra	A „stopped-flow” műszer.	15
5. ábra	A „quenched-flow” műszer.	17
6. ábra	Az NTP-hidrolízis amplitúdók sínhossz függése egyszeri futásos transzlokáció során a sín végéről (A) illetve random helyről (B) indulva.	22
7. ábra	Az NLLS analízis igazolása globális kinetikai szimulációkkal.	23
8. ábra	A sín végéhez kötött enzim molekulák által végzett extra NTP hidrolízis ciklusok hatása a megfigyelt NTP hidrolízis amplitúdókra	25
9. ábra	A BLM transzlokációjának modellje	27
10. ábra	A BLM helikáz transzlokációjának karakterizálása egyszeri futásos kísérletek során	29
11. ábra	A BLMHM <i>steady-state</i> paramétereinek ssDNS hosszfüggése	32
12. ábra	A RecQ helikáz <i>ATP-függő steady-state</i> ATP-áz aktivitása	33
13. ábra	Nukleotid (mdATP, mdADP) kötés a RecQ-hoz	35
14. ábra	Az ATP hasítás kinetikájának vizsgálata	36
15. ábra	A foszfát felszabadulás kinetikája	39
16. ábra	A RecQ DNS kötése	40
17. ábra	A RecQ helikáz DNS kötését jellemző Trp fluoreszcencia tranziensek amplitúdói	41
18. ábra	A RecQ Trp fluoreszcencia spektrumában bekövetkező változások DNS kötés hatására	42
19. ábra	A RecQ helikáz DNS menti transzlokációjának modellje	44
20. ábra	RecQ általi ATP hidrolízisből származó Pi termelés ssDNS mentén történő transzlokáció során egyszeri futásos kísérleti elrendezésben	45
21. ábra	A RecQ hidrolízis profilok DxSO ₄ koncentrációfüggése ssDNS jelenlétében	48
22. ábra	Nem ideális csapda viselkedésének modellezése egyszeri futásos kísérletek során	50
23. ábra	A RecQ <i>steady-state</i> DNS aktivált ATP-áz aktivitásának oligo-dT hossz függése	51
24. ábra	Pi termelődés a RecQ dT72 menti transzlokációjának iniciációja során különböző keverési körülmények között	53
25. ábra	RecQ disszociációja ssDNS-ről egyszeri futás során a Trp fluoreszcencia	55
26. ábra	A RecQ ssDNS menti transzlokáció globális kinetikai szimulációja egyszeri futásos körülmények között	59

RÖVIDÍTÉSEK

Rövidítés	jelentés
7MG	7-metil-guanozin
ADP	adenozin-5'-difoszfát
ADP·AlF ₄	adenozin-difoszfát-aluminium-fluorid komplex (poszthiolitikus analóg)
AlCl ₃	aluminium-klorid
AMPPNP	adenozin 5'-(β,γ-imido)trifoszfát
apo	az enzim szunsztrátmentes állapota
ATP	adenozin-5'-trifoszfát
ATP _γ S	adenozin 5'-(gamma-tiotrifoszfát)
BLM	Bloom Szindróma helikáz
BSA	marha (bovin) szérum albumin
DNS	deoxi-ribo-nukleinsav
ds	kettős szálú (nukleinsav)
dT _n	n-hosszúságú oligo-deoxi-timidin
DTT	ditiotritol
DxSO ₄	dextrán-szulfát
E	enzim
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
FeSO ₄	vas-szulfát
FRET	Förster Rezonancia Energia Transzfer
H ₂ PO ₄ ⁻	dihidrogén-foszfát
HCl	sósav vagy hidrogén-klorid
HR	homológ rekombináció
HRDC	Helikáz/RN-áz D C-terminális Domén
IPTG	izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid
KCl	kálium-klorid
mdATP, mdADP	3'-(N-methylantraniloyl)-2'-deoxy-ATP és -ADP
MDCC	7-dietilamino-3-(((2-malemidil)etil)amino)karbonil)kumarin
MgSO ₄	magnézium-szulfát
MS	tömeg spektrometria
MW	molekulatömeg
Na ₂ SO ₄	nátrium-szulfát
NaCl	nátrium-klorid
NADH	redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid
NaF	nátrium-fluorid
NATA	N-acetil-triptofán-amid
NH ₄ Cl	ammónium-klorid
NHEJ	nem-homológ végek összekapcsolódása
NLLS	nem lineáris legkisebb négyzetek módszere
NTP	nukleozid-trifoszfát
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis

PBP	foszfátkötő fehérje
PCl ₅	foszfor-pentaklorid
PCR	polimeráz láncreakció
PDB	Protein Data Bank
pdT	poli-dezoxi-timidin
PEP	foszfo-enol-piruvát
P _i	anorganikus foszfát
PK/LDH	piruvát kináz/laktát dehidrogenáz
PML	polimielitikus leukémia
PMT	fotoelektron-sokszorozó
PNP	purin-nukleotid-foszforiláz
PTO	foszforotioát
Q	RecQ
QF	„quenched-flow”
RNS	ribonukleinsav
RQC	RecQ-C-terminális domén
SDS	nátrium-lauril-szulfát
SDSA	szintézisfüggő szálanelláció
SEM	az átlagtól való standard eltérés
SF	„stopped-flow”
ss	egyszálú (nukleinsav)
TBE	trisz-bórsav-EDTA
TopIII	topoizimeráz III
Trp	triptofán
UV	ultraibolya-sugárzás
WRN	Werner szindróma helikáz

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK

I. Tudományos közlemények

Sarlós, K., Gyimesi, M., Kovács, M (2012) RecQ helicase translocates along single-stranded DNA with a moderate processivity and tight mechanochemical coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* (Publikálásra elfogadva).

Gyimesi, M., **Sarlós, K.**, Kovács, M (2010) Processive translocation mechanism of the human Bloom's syndrome helicase along single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res* 38:4404-4414.

Gyimesi, M., **Sarlós, K.**, Derényi, I., Kovács, M (2010) Streamlined determination of processive run length and mechanochemical coupling of nucleic acid motor activities. *Nucleic Acids Res* 38:e102.

Sarlós, K., Gyimesi, M., Kele, Z., Kovács, M (2012): Insights into the DNA activation of the RecQ enzymatic cycle reveal mechanistic diversity within RecQ-family helicases. – előkészületben

Sarlós, K., Gyimesi, M., Kovács, M (2012): Allosteric effect of nucleotide on the DNA interaction of RecQ helicase. – előkészületben

II. Konferencia kivonatok

Sarlós, K., Gyimesi, M., Kovács, M. (2010): Mechanism of DNA-dependent enzymatic activation of *Escherichia coli* RecQ helicase. *54th Annual Meeting of the Biophysical Society*, San Francisco, CA, USA

Gyimesi, M., Sarlós, K., Kovács, M. (2009): Mechanism of translocation of the BLM helicase along DNA. *Central-Eastern European INSTRUCT Meeting, Budapest*

Gyimesi, M., **Sarlós, K., Kovács, M.** (2009): Mechanism of translocation of the BLM helicase along DNA. *EMBO Young Investigator Meeting, Istanbul, Turkey*

Gyimesi, M., **Sarlós, K., Kovács, M.** (2009): Processive translocation mechanism of the human Bloom's syndrome helicase along single-stranded DNA. *EMBO Meeting on Helicases and Nucleic Acid Machines, Les Diablerets, Switzerland*

Sarlós, K., Gyimesi, M., Kovács, M. (2009): Mechanism of DNA-dependent enzymatic activation of *Escherichia coli* RecQ helicase. *EMBO Meeting on Helicases and Nucleic Acid Machines, Les Diablerets, Switzerland*

Gyimesi, M., Sarlós, K., Kovács, M. (2009): Processive translocation mechanism of the human Bloom's syndrome helicase. *Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, Budapest, Hungary*

Sarlós, K., Gyimesi, M., Kovács, M. (2009): Mechanism of DNA-dependent enzymatic activation of *Escherichia coli* RecQ helicase. *Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, Budapest, Hungary*

Gyimesi, M., Sarlós, K., Kovács, M. (2009): Working mechanism of the human Bloom's syndrome helicase. *53rd Annual Meeting of the Biophysical Society, Boston, MA, USA*
(Az előadó szerző aláhúzva)

EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

I. Tudományos közlemények

Gyimesi, M., Harami G., **Sarlós, K.**, Hazai E., Bikadi, Zs., Kovacs, M (2012): Complex activities of the human Bloom's syndrome helicase are encoded in a core region comprising the RecA and Zn-binding domains. *Nucleic Acids Res* [Epub ahead of print].

Gyimesi, M., **Sarlós, K.**, Billington, N., Pires, H., Módos, K., Kellermayer M., Kovács M. (2012): Monomeric Form of the Human Bloom's Syndrome Helicase is Recruited to Various Homologous Recombination Intermediates. – bírálat alatt

II. Konferencia kivonatok

Gyimesi, M., **Sarlós, K.**, Pires, H., Nagy, N., Módos, K., Kellermayer, M., Kovács, M. (2012): Dynamic switch between assembly states of the human Bloom's syndrome helicase during homologous recombination. *55th Annual Meeting of the Biophysical Society*, San Diego, CA, USA

Sarlós, K., Gyimesi, M., Pires, H., Módos, K., Kellermayer, M., Kovács, M. (2011): Dynamic switch between assembly states of the human Bloom's syndrome helicase during homologous recombination. *FASEB Meeting on Helicases and Nucleic Acid Translocases*, Steamboat Springs, CO, USA

Harami, G., Gyimesi, M., **Sarlós, K.**, Kovács, M. (2011): Functional anatomy of the human Bloom's syndrome helicase. *FASEB Meeting on Helicases and Nucleic Acid Translocases*, Steamboat Springs, CO, USA

Gyimesi, M., Sarlós, K., Harami G., Kovács, M. (2011): The minimal functional domain of the human Bloom's Syndrome Helicase. *55th Annual Meeting of the Biophysical Society*, Baltimore, MD, USA

Sarlós, K., Málnási-Csizmadia, A., **Kovács, M.** (2008): Effect of mechanical load on the kinetics of an enzyme reaction. *Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society, Szeged, Hungary*

Nagy, N., **Sarlós, K.**, Takács, B., Tóth, J., Yang, Y., Pearson, D. S., Hetényi, C., Nyitray, L., Málnási-Csizmadia, A., Geeves, M. A., Bagshaw, C. R., Sellers, J. R., Brown, J. H., Szent-Györgyi, A. G., Cohen, C., **Kovács, M.** (2008): Routes of allosteric communication between functional parts of the myosin motor. *Scientific Meeting of International Research Scholars of the Howard Hughes Medical Institute*, Lisbon, Portugal

Sarlós, K., Thirumurugan, K., Knight, P. J., Sellers, J. R., **Kovács, M.** (2007): Load-dependent mechanism of non-muscle myosin 2 enables highly efficient functioning. *Molecular Recognition Conference*, Pécs, Hungary

Sarlós, K., Málnási-Csizmadia, A., Kovács, M. (2007): Effect of mechanical load on the kinetics and thermodynamics of a motor enzyme reaction. *Molecular Recognition Conference*, Pécs, Hungary

Sarlós, K., Thirumurugan, K., Knight, P. J., Sellers, J. R., **Kovács, M.** (2007): Load-dependent mechanism of non-muscle myosin 2 enables highly efficient functioning. *Annual Meeting of the Hungarian Biochemical Society*, Debrecen, Hungary

(Az előadó szerző aláhúzva)

IRODALOMJEGYZÉK

1. Wu, L, Hickson, ID (2006) DNA helicases required for homologous recombination and repair of damaged replication forks. *Annu Rev Genet* 40:279-306.
2. Singleton, MR, Dillingham, MS, Wigley, DB (2007) Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu Rev Biochem* 76:23-50.
3. Ye, J, Osborne, AR, Groll, M, Rapoport, TA (2004) RecA-like motor ATPases--lessons from structures. *Biochim Biophys Acta* 1659:1-18.
4. Walker, JE, Saraste, M, Runswick, MJ, Gay, NJ (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1:945-951.
5. Scheffzek, K et al. (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 277:333-338.
6. Velankar, SS, Soultanas, P, Dillingham, MS, Subramanya, HS, Wigley, DB (1999) Crystal structures of complexes of PcrA DNA helicase with a DNA substrate indicate an inchworm mechanism. *Cell* 97:75-84.
7. Lee, JY, Yang, W (2006) UvrD helicase unwinds DNA one base pair at a time by a two-part power stroke. *Cell* 127:1349-1360.
8. Levin, MK, Gurjar, M, Patel, SS (2005) A Brownian motor mechanism of translocation and strand separation by hepatitis C virus helicase. *Nat Struct Mol Biol* 12:429-435.
9. Tomko, EJ, Fischer, CJ, Niedziela-Majka, A, Lohman, TM (2007) A nonuniform stepping mechanism for E. coli UvrD monomer translocation along single-stranded DNA. *Mol Cell* 26:335-347.
10. Lucius, AL, Lohman, TM (2004) Effects of temperature and ATP on the kinetic mechanism and kinetic step-size for E.coli RecBCD helicase-catalyzed DNA unwinding. *J Mol Biol* 339:751-771.
11. Dumont, S et al. (2006) RNA translocation and unwinding mechanism of HCV NS3 helicase and its coordination by ATP. *Nature* 439:105-108.
12. Lohman, TM, Bjornson, KP (1996) Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding. *Annu Rev Biochem* 65:169-214.
13. Pyle, AM (2008) Translocation and unwinding mechanisms of RNA and DNA helicases. *Annual review of biophysics* 37:317-336.
14. Alexander E. Gorbalenyaa, EVK (1993) Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr Opin Struct Biol* 3:419-429.
15. Cordin, O, Banroques, J, Tanner, NK, Linder, P (2006) The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367:17-37.
16. Pang, PS, Jankowsky, E, Planet, PJ, Pyle, AM (2002) The hepatitis C viral NS3 protein is a processive DNA helicase with cofactor enhanced RNA unwinding. *EMBO J* 21:1168-1176.
17. Tai, CL, Chi, WK, Chen, DS, Hwang, LH (1996) The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J Virol* 70:8477-8484.
18. Gu, M, Rice, CM (2010) Three conformational snapshots of the hepatitis C virus NS3 helicase reveal a ratchet translocation mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:521-528.
19. Bennett, RJ, Keck, JL (2004) Structure and function of RecQ DNA helicases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 39:79-97.
20. Frei, C, Gasser, SM (2000) RecQ-like helicases: the DNA replication checkpoint connection. *J Cell Sci* 113 (Pt 15):2641-2646.
21. Harrigan, JA, Bohr, VA (2003) Human diseases deficient in RecQ helicases. *Biochimie* 85:1185-1193.
22. Khakhar, RR, Cobb, JA, Bjergbaek, L, Hickson, ID, Gasser, SM (2003) RecQ helicases: multiple roles in genome maintenance. *Trends Cell Biol* 13:493-501.

23. Bachrati, CZ, Hickson, ID (2008) RecQ helicases: guardian angels of the DNA replication fork. *Chromosoma* 117:219-233.
24. Bachrati, C, Hickson, I (2003) RecQ helicases: suppressors of tumorigenesis and premature aging. *Biochem J* 374:577-606.
25. Umezu, K, Nakayama, K, Nakayama, H (1990) Escherichia coli RecQ protein is a DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5363-5367.
26. Shereda, RD, Reiter, NJ, Butcher, SE, Keck, JL (2009) Identification of the SSB binding site on E. coli RecQ reveals a conserved surface for binding SSB's C terminus. *J Mol Biol* 386:612-625.
27. Janscak, P et al. (2003) Characterization and mutational analysis of the RecQ core of the bloom syndrome protein. *J Mol Biol* 330:29-42.
28. Wu, L et al. (2005) The HRDC domain of BLM is required for the dissolution of double Holliday junctions. *EMBO J* 24:2679-2687.
29. Bernstein, DA, Keck, JL (2003) Domain mapping of Escherichia coli RecQ defines the roles of conserved N- and C-terminal regions in the RecQ family. *Nucleic Acids Res* 31:2778-2785.
30. Huang, S et al. (1998) The premature ageing syndrome protein, WRN, is a 3'→5' exonuclease. *Nat Genet* 20:114-116.
31. Opresko, PL, Laine, JP, Brosh, RM, Seidman, MM, Bohr, VA (2001) Coordinate action of the helicase and 3' to 5' exonuclease of Werner syndrome protein. *J Biol Chem* 276:44677-44687.
32. Perry, JJP et al. (2006) WRN exonuclease structure and molecular mechanism imply an editing role in DNA end processing. *Nat Struct Mol Biol* 13:414-422.
33. Pike, ACW et al. (2009) Structure of the human RECQ1 helicase reveals a putative strand-separation pin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1039-1044.
34. Bernstein, DA, Zittel, MC, Keck, JL (2003) High-resolution structure of the E.coli RecQ helicase catalytic core. *EMBO J* 22:4910-4921.
35. Bernstein, DA, Keck, JL (2005) Conferring substrate specificity to DNA helicases: role of the RecQ HRDC domain. *Structure* 13:1173-1182.
36. Sato, A et al. (2010) Solution structure of the HRDC domain of human Bloom syndrome protein BLM. *J Biochem* 148:517-525.
37. Kim, YM, Choi, BS (2010) Structure and function of the regulatory HRDC domain from human Bloom syndrome protein. *Nucleic Acids Res* 38:7764-7777.
38. Kitano, K, Yoshihara, N, Hakoshima, T (2007) Crystal structure of the HRDC domain of human Werner syndrome protein, WRN. *J Biol Chem* 282:2717-2728.
39. Bohr, VA (2008) Rising from the RecQ-age: the role of human RecQ helicases in genome maintenance. *Trends Biochem Sci* 33:609-620.
40. Machwe, A, Xiao, L, Groden, J, Matson, SW, Orren, DK (2005) RecQ family members combine strand pairing and unwinding activities to catalyze strand exchange. *J Biol Chem* 280:23397-23407.
41. Szostak, JW, Orr-Weaver, TL, Rothstein, RJ, Stahl, FW (1983) The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33:25-35.
42. Wu, L, Hickson, ID (2003) The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* 426:870-874.
43. Wu, L (2007) Role of the BLM helicase in replication fork management. *DNA Repair (Amst)* 6:936-944.
44. German, J (1993) Bloom syndrome: a mendelian prototype of somatic mutational disease. *Medicine (Baltimore)* 72:393-406.
45. Nathan A. Ellis, * (1995) The Bloom's Syndrome Gene Product Is Homologous to RecQ Helicases. *Cell* 83:655-668.

46. Karow, JK, Chakraverty, RK, Hickson, ID (1997) The Bloom's syndrome gene product is a 3'-5' DNA helicase. *J Biol Chem* 272:30611-30614.
47. Yu, CE et al. (1996) Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 272:258-262.
48. Shen, JC, Loeb, LA (2000) The Werner syndrome gene: the molecular basis of RecQ helicase-deficiency diseases. *Trends Genet* 16:213-220.
49. Vennos, EM, James, WD (1995) Rothmund-Thomson syndrome. *Dermatol Clin* 13:143-150.
50. Kitao, S et al. (1999) Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome. *Nat Genet* 22:82-84.
51. Schurman, SH et al. (2009) Direct and indirect roles of RECQL4 in modulating base excision repair capacity. *Hum Mol Genet* 18:3470-3483.
52. Van Maldergem, L et al. (2006) Revisiting the craniosynostosis-radial ray hypoplasia association: Baller-Gerold syndrome caused by mutations in the RECQL4 gene. *J Med Genet* 43:148-152.
53. Siitonen, HA et al. (2003) Molecular defect of RAPADILINO syndrome expands the phenotype spectrum of RECQL diseases. *Hum Mol Genet* 12:2837-2844.
54. Bugreev, DV, Yu, X, Egelman, EH, Mazin, AV (2007) Novel pro- and anti-recombination activities of the Bloom's syndrome helicase. *Genes Dev* 21:3085-3094.
55. Langlois, RG, Bigbee, WL, Jensen, RH, German, J (1989) Evidence for increased *in vivo* mutation and somatic recombination in Bloom's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:670-674.
56. Adams, MD, McVey, M, Sekelsky, JJ (2003) Drosophila BLM in double-strand break repair by synthesis-dependent strand annealing. *Science* 299:265-267.
57. Hand, R, German, J (1975) A retarded rate of DNA chain growth in Bloom's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:758-762.
58. Gianneli, F, Benson, PF, Pawsey, SA, Polani, PE (1977) Ultraviolet light sensitivity and delayed DNA-chain maturation in Bloom's syndrome fibroblasts. *Nature* 265:466-469.
59. Chan, KL, North, PS, Hickson, ID (2007) BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. *EMBO J* 26:3397-3409.
60. Hemphill, AW et al. (2009) Topo IIIalpha and BLM act within the Fanconi anemia pathway in response to DNA-crosslinking agents. *Cytogenet Genome Res* 125:165-175.
61. Deans, AJ, West, SC (2011) DNA interstrand crosslink repair and cancer. *Nat Rev Cancer* 11:467-480.
62. Suhasini, AN, Brosh, RM (2012) Fanconi anemia and Bloom's syndrome crosstalk through FANCD1-BLM helicase interaction. *Trends Genet* 28:7-13.
63. van Brabant, AJ et al. (2000) Binding and melting of D-loops by the Bloom syndrome helicase. *Biochemistry* 39:14617-14625.
64. Bachrati, CZ, Borts, RH, Hickson, ID (2006) Mobile D-loops are a preferred substrate for the Bloom's syndrome helicase. *Nucleic Acids Res* 34:2269-2279.
65. Hanada, K et al. (1997) RecQ DNA helicase is a suppressor of illegitimate recombination in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3860-3865.
66. Harmon, FG, Kowalczykowski, SC (1998) RecQ helicase, in concert with RecA and SSB proteins, initiates and disrupts DNA recombination. *Genes Dev* 12:1134-1144.
67. Courcelle, J, Hanawalt, PC (1999) RecQ and RecJ process blocked replication forks prior to the resumption of replication in UV-irradiated *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 262:543-551.
68. Handa, N, Morimatsu, K, Lovett, ST, Kowalczykowski, SC (2009) Reconstitution of initial steps of dsDNA break repair by the RecF pathway of *E. coli*. *Genes Dev* 23:1234-1245.

69. Handa, N, Ichige, A, Kobayashi, I (2009) Contribution of RecFOR machinery of homologous recombination to cell survival after loss of a restriction-modification gene complex. *Microbiology* 155:2320-2332.
70. Umezui, K, Nakayama, H (1993) RecQ DNA helicase of *Escherichia coli*. Characterization of the helix-unwinding activity with emphasis on the effect of single-stranded DNA-binding protein. *J Mol Biol* 230:1145-1150.
71. Harmon, FG, Kowalczykowski, SC (2001) Biochemical characterization of the DNA helicase activity of the *Escherichia coli* RecQ helicase. *J Biol Chem* 276:232-243.
72. Xu, HQ et al. (2003) The *Escherichia coli* RecQ helicase functions as a monomer. *J Biol Chem* 278:34925-34933.
73. Zhang, XD et al. (2006) *Escherichia coli* RecQ is a rapid, efficient, and monomeric helicase. *J Biol Chem* 281:12655-12663.
74. Dou, SX, Xi, XG (2010) Fluorometric assays for characterizing DNA helicases. *Methods* 51:295-302.
75. Pan, BY et al. (2010) Mutual inhibition of RecQ molecules in DNA unwinding. *J Biol Chem* 285:15884-15893.
76. Cheok, CF, Wu, L, Garcia, PL, Janscak, P, Hickson, ID (2005) The Bloom's syndrome helicase promotes the annealing of complementary single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res* 33:3932-3941.
77. Harmon, FG, DiGate, RJ, Kowalczykowski, SC (1999) RecQ helicase and topoisomerase III comprise a novel DNA strand passage function: a conserved mechanism for control of DNA recombination. *Mol Cell* 3:611-620.
78. Dou, SX, Wang, PY, Xu, HQ, Xi, XG (2004) The DNA binding properties of the *Escherichia coli* RecQ helicase. *J Biol Chem* 279:6354-6363.
79. Moore, KJ, Lohman, TM (1994) Kinetic mechanism of adenine nucleotide binding to and hydrolysis by the *Escherichia coli* Rep monomer. 1. Use of fluorescent nucleotide analogues. *Biochemistry* 33:14550-14564.
80. Moore, KJ, Lohman, TM (1994) Kinetic mechanism of adenine nucleotide binding to and hydrolysis by the *Escherichia coli* Rep monomer. 2. Application of a kinetic competition approach. *Biochemistry* 33:14565-14578.
81. Toseland, CP, Martinez-Senac, MM, Slatter, AF, Webb, MR (2009) The ATPase cycle of PcrA helicase and its coupling to translocation on DNA. *J Mol Biol* 392:1020-1032.
82. Henn, A, Cao, W, Hackney, DD, De La Cruz, EM (2008) The ATPase cycle mechanism of the DEAD-box rRNA helicase, DbpA. *J Mol Biol* 377:193-205.
83. Matson, SW, George, JW (1987) DNA helicase II of *Escherichia coli*. Characterization of the single-stranded DNA-dependent NTPase and helicase activities. *J Biol Chem* 262:2066-2076.
84. Benarroch, D et al. (2004) The RNA helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue virus protein NS3 are Mg²⁺-dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core. *Virology* 328:208-218.
85. Wang, CC, Huang, ZS, Chiang, PL, Chen, CT, Wu, HN (2009) Analysis of the nucleoside triphosphatase, RNA triphosphatase, and unwinding activities of the helicase domain of dengue virus NS3 protein. *FEBS Lett* 583:691-696.
86. Antony, E et al. (2009) Srs2 disassembles Rad51 filaments by a protein-protein interaction triggering ATP turnover and dissociation of Rad51 from DNA. *Mol Cell* 35:105-115.
87. Gutfreund & Gutfreund, H. *Kinetics for the Life Sciences* (Cambridge Univ Pr, 1995).
88. Johnson, K. *Kinetic analysis of macromolecules* (Oxford University Press, 2003).
89. Gyimesi, M, Sarlós, K, Derényi, I, Kovács, M (2010) Streamlined determination of processive run length and mechanochemical coupling of nucleic acid motor activities. *Nucleic Acids Res* 38:e102.

90. Dillingham, MS, Wigley, DB, Webb, MR (2000) Demonstration of unidirectional single-stranded DNA translocation by PcrA helicase: measurement of step size and translocation speed. *Biochemistry* 39:205-212.
91. Dillingham, MS, Wigley, DB, Webb, MR (2002) Direct measurement of single-stranded DNA translocation by PcrA helicase using the fluorescent base analogue 2-aminopurine. *Biochemistry* 41:643-651.
92. Fischer, CJ, Yamada, K, Fitzgerald, DJ (2009) Kinetic mechanism for single-stranded DNA binding and translocation by *Saccharomyces cerevisiae* Isw2. *Biochemistry* 48:2960-2968.
93. Fischer, CJ, Maluf, NK, Lohman, TM (2004) Mechanism of ATP-dependent translocation of *E. coli* UvrD monomers along single-stranded DNA. *J Mol Biol* 344:1287-1309.
94. Fischer, CJ, Lohman, TM (2004) ATP-dependent translocation of proteins along single-stranded DNA: models and methods of analysis of pre-steady state kinetics. *J Mol Biol* 344:1265-1286.
95. Lucius, AL et al. (2002) DNA unwinding step-size of *E. coli* RecBCD helicase determined from single turnover chemical quenched-flow kinetic studies. *J Mol Biol* 324:409-428.
96. Stano, NM et al. (2005) DNA synthesis provides the driving force to accelerate DNA unwinding by a helicase. *Nature* 435:370-373.
97. Jeong, YJ, Levin, MK, Patel, SS (2004) The DNA-unwinding mechanism of the ring helicase of bacteriophage T7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7264-7269.
98. Gong, P, Campagnola, G, Peersen, OB (2009) A quantitative stopped-flow fluorescence assay for measuring polymerase elongation rates. *Anal Biochem* 391:45-55.
99. Brune, M, Hunter, JL, Corrie, JE, Webb, MR (1994) Direct, real-time measurement of rapid inorganic phosphate release using a novel fluorescent probe and its application to actomyosin subfragment 1 ATPase. *Biochemistry* 33:8262-8271.
100. Brendza, KM et al. (2005) Autoinhibition of *Escherichia coli* Rep monomer helicase activity by its 2B subdomain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:10076-10081.
101. Niedziela-Majka, A, Chesnik, MA, Tomko, EJ, Lohman, TM (2007) *Bacillus stearothermophilus* PcrA monomer is a single-stranded DNA translocase but not a processive helicase *in vitro*. *J Biol Chem* 282:27076-27085.
102. Ricketts, CR (1952) Dextran sulphate--a synthetic analogue of heparin. *Biochem J* 51:129-133.
103. Gyimesi, M, Sarlós, K, Kovács, M (2010) Processive translocation mechanism of the human Bloom's syndrome helicase along single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res* 38:4404-4414.
104. Sarlós, K, Gyimesi, M, Kovács, M (2012) RecQ helicase translocates along single-stranded DNA with a moderate processivity and tight mechanochemical coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* (Publikálásra elfogadva).
105. Zittel, MC, Keck, JL (2005) Coupling DNA-binding and ATP hydrolysis in *Escherichia coli* RecQ: role of a highly conserved aromatic-rich sequence. *Nucleic Acids Res* 33:6982-6991.
106. Hackney, DD, Stempel, KE, Boyer, PD (1980) Oxygen-18 probes of enzymic reactions of phosphate compounds. *Methods Enzymol* 64:60-83.
107. Rad, B, Kowalczykowski, SC (2012) Efficient coupling of ATP hydrolysis to translocation by RecQ helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:1443-1448.
108. Rajagopal, V, Gurjar, M, Levin, MK, Patel, SS (2010) The protease domain increases the translocation stepping efficiency of the hepatitis C virus NS3-4A helicase. *J Biol Chem* 285:17821-17832.

109. Byrd, AK et al. (2012) Dda Helicase Tightly Couples Translocation on Single-Stranded DNA to Unwinding of Duplex DNA: Dda Is an Optimally Active Helicase. *J Mol Biol*
110. Lohman, T, Kowalczykowski, S (1981) Kinetics and mechanism of the association of the bacteriophage T4 gene 32 (helix destabilizing) protein with single-stranded nucleic acids. Evidence for protein translocation. *J Mol Biol* 152:67-109.
111. Jezewska, MJ, Bujalowski, W (1996) Global conformational transitions in Escherichia coli primary replicative helicase DnaB protein induced by ATP, ADP, and single-stranded DNA binding. Multiple conformational states of the helicase hexamer. *J Biol Chem* 271:4261-4265.
112. Jezewska, MJ, Bujalowski, W (2000) Interactions of Escherichia coli replicative helicase PriA protein with single-stranded DNA. *Biochemistry* 39:10454-10467.
113. Wong, I, Lohman, TM (1992) Allosteric effects of nucleotide cofactors on Escherichia coli Rep helicase-DNA binding. *Science* 256:350-355.
114. Yang, Y et al. (2010) Kinetic mechanism of DNA unwinding by the BLM helicase core and molecular basis for its low processivity. *Biochemistry* 49:656-668.
115. Curti, E, Smerdon, SJ, Davis, EO (2007) Characterization of the helicase activity and substrate specificity of Mycobacterium tuberculosis UvrD. *J Bacteriol* 189:1542-1555.
116. Manosas, M, Xi, XG, Bensimon, D, Croquette, V (2010) Active and passive mechanisms of helicases. *Nucleic Acids Res* 38:5518-5526.
117. Bianco, PR et al. (2001) Processive translocation and DNA unwinding by individual RecBCD enzyme molecules. *Nature* 409:374-378.
118. Korolev, S, Hsieh, J, Gauss, GH, Lohman, TM, Waksman, G (1997) Major domain swiveling revealed by the crystal structures of complexes of E. coli Rep helicase bound to single-stranded DNA and ADP. *Cell* 90:635-647.
119. Kim, JL et al. (1998) Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure* 6:89-100.
120. Büttner, K, Nehring, S, Hopfner, KP (2007) Structural basis for DNA duplex separation by a superfamily-2 helicase. *Nat Struct Mol Biol* 14:647-652.
121. Guo, RB et al. (2007) Structural and functional analyses of disease-causing missense mutations in Bloom syndrome protein. *Nucleic Acids Res* 35:6297-6310.
122. Sengoku, T, Nureki, O, Nakamura, A, Kobayashi, S, Yokoyama, S (2006) Structural basis for RNA unwinding by the DEAD-box protein Drosophila Vasa. *Cell* 125:287-300.
123. Bono, F, Ebert, J, Lorentzen, E, Conti, E (2006) The crystal structure of the exon junction complex reveals how it maintains a stable grip on mRNA. *Cell* 126:713-725.
124. Andersen, CBF et al. (2006) Structure of the exon junction core complex with a trapped DEAD-box ATPase bound to RNA. *Science* 313:1968-1972.
125. Li, N et al. (2010) Multiple Escherichia coli RecQ helicase monomers cooperate to unwind long DNA substrates: a fluorescence cross-correlation spectroscopy study. *J Biol Chem* 285:6922-6936.
126. Karow, JK, Newman, RH, Freemont, PS, Hickson, ID (1999) Oligomeric ring structure of the Bloom's syndrome helicase. *Curr Biol* 9:597-600.
127. Ali, JA, Maluf, NK, Lohman, TM (1999) An oligomeric form of E. coli UvrD is required for optimal helicase activity. *J Mol Biol* 293:815-834.
128. Maluf, NK, Fischer, CJ, Lohman, TM (2003) A Dimer of Escherichia coli UvrD is the active form of the helicase *in vitro*. *J Mol Biol* 325:913-935.
129. Maluf, NK, Ali, JA, Lohman, TM (2003) Kinetic mechanism for formation of the active, dimeric UvrD helicase-DNA complex. *J Biol Chem* 278:31930-31940.
130. Cheng, W, Hsieh, J, Brendza, KM, Lohman, TM (2001) E. coli Rep oligomers are required to initiate DNA unwinding *in vitro*. *J Mol Biol* 310:327-350.

131. Matlock, DL et al. (2010) Investigation of translocation, DNA unwinding, and protein displacement by NS3h, the helicase domain from the hepatitis C virus helicase. *Biochemistry* 49:2097-2109.
132. Compton, SA, Tolun, G, Kamath-Loeb, AS, Loeb, LA, Griffith, JD (2008) The Werner syndrome protein binds replication fork and holliday junction DNAs as an oligomer. *J Biol Chem* 283:24478-24483.
133. Muzzolini, L et al. (2007) Different quaternary structures of human RECQ1 are associated with its dual enzymatic activity. *PLoS Biol* 5:e20.
134. Vindigni, A, Hickson, ID (2009) RecQ helicases: multiple structures for multiple functions? *HFSP journal* 3:153-164.
135. Rad, B, Kowalczykowski, SC (2012) Translocation of E. coli RecQ Helicase on Single-Stranded DNA. *Biochemistry* 51:2921-2929.
136. Hickson, ID, Mankouri, HW (2011) Processing of homologous recombination repair intermediates by the Sgs1-Top3-Rmi1 and Mus81-Mms4 complexes. *Cell Cycle* 10:3078-3085.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Kovács Mihálynak, aki bevezetett a „tudományos gondolkodás” világába, valamint számos, nem szakmai kérdésben is sok tanácsot adott. Köszönet illeti Dr. Gyimesi Mátét, akitől rengeteg, „labormunkával” kapcsolatos tudást kaptam, valamint a sok baráti beszélgetés is igen emlékezetes marad. Köszönöm Nagy Nikolettnek a hosszú évek során mellettem töltött időt, és a barátságot, amit ennek köszönhetünk. Köszönöm Simon Zoltánnak a Photosop-os oktatást, és a szakmai és kevésbé szakmai beszélgetéseket. Köszönöm Harami Gábornak a szakmai együttműködést. Köszönöm Várkuti Boglárkának a tudományos és személyes vitákat, beszélgetéseket. Köszönöm Dr. Málnási-Csizmadia Andrásnak a kritikákat, és a gondolatébresztő beszélgetéseket. Köszönöm a Stoci és Málna laborok minden tagjának a jó légkört, melyben dolgozhattam. Köszönöm Professzor Hegyi Györgynek, hogy elindított a tudományos pályán. Köszönöm Professzor Gráf Lászlónak, és Professzor Nyitray Lászlónak, hogy a tanszéki munkámat lehetővé tette. Köszönöm Krajcsi Anikónak a sok segítséget az ügyintézésben. Köszönöm az ELTE Biokémiai Tanszék munkatársainak az együttműködést, és a jó hangulatot.

Köszönöm családomnak, ezen belül különösen a szüleimnek, Sarlós Jánosnak és Sarlósné Bánhegyi Lídiának a nevelést, valamint hogy mindig támogattak abban, hogy olyasmivel foglalkozhassak, ami érdekel. Köszönöm bátyámnak, Sarlós Tamásnak, hogy mind példamutatásával, mind jótestvéri barátságával olyan sokat segített nekem. Köszönöm páromnak, Bánfalvi Istvánnak, hogy mindig, a jó és a rossz pillanatokban is mellettem állt.